

**DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT BEI
CHRONISCHER LYMPHATISCHER LEUKÄMIE UND
LYMPHOGRANULOMATOSE IM VERGLEICH ZU
NORMALPERSONEN – EINE
LYMPHOZYTENKINETISCHE UNTERSUCHUNG**

Reinhold Eckstein

1970



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der I. Medizinischen Abteilung
des Städtischen Krankenhauses München - Schwabing
Chefarzt: Prof. Dr. H. Begemann

DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT BEI CHRONISCHER LYMPHATISCHER
LEUKÄMIE UND LYMPHOGRANULOMATOSE IM VERGLEICH ZU NOR-
MALPERSONEN - EINE LYMPHOZYTENKINETISCHE UNTERSUCHUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Reinhold Eckstein

aus

München

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Begemann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.10.1978



Meiner Mutter
Edeltraud Eckstein
in Dankbarkeit gewidmet



GLIEDERUNG

1. Einleitung
 - 1.1 Lymphozytenpopulationen
 - 1.11 B-Lymphozyten
 - 1.12 T-Lymphozyten
 - 1.13 Interaktionen zwischen T- und B-Population
 - 1.14 Zusammenfassung
 - 1.2 Wirkung des Phytohämagglutinins (PHA)
 - 1.3 Chronische lymphatische Leukämie und Lymphogranulomatose mit Einschränkungen der PHA-Stimulierbarkeit der Lymphozyten
 - 1.31 Chronische lymphatische Leukämie
 - 1.32 Lymphogranulomatose
 - 1.4 Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten, Patienten mit chronischer Lymphadenose sowie mit Lymphogranulomatose
 - 1.41 Normalpatienten
 - 1.42 Chronische Lymphadenose
 - 1.43 Lymphogranulomatose
 - 1.44 Zusammenfassung
 - 1.5 Ziele der vorliegenden Untersuchung
2. Material und Methode
 - 2.1 Markierungsverfahren
 - 2.2 Die PHA-Kultur
 - 2.21 Verwendete Reagenzien
 - 2.22 Gewinnung der Leukozyten
 - 2.23 Gewinnung der Lymphozyten
 - 2.24 Anlegen der Lymphozytenkulturen
 - 2.241 Berechnung der Kulturen
 - 2.242 Erstellung der Kulturen
 - 2.243 Das Ernten der Kulturen
 - 2.3 Die Autoradiographie
 - 2.4 Morphologische Auswertung

- 2.5 Untersuchte Patienten
 - 2.51 Normalpatienten
 - 2.52 Patienten mit Chronischer lymphatischer Leukämie
 - 2.53 Patienten mit Lymphogranulomatose

- 3. Diskussion der Methode

- 4. Ergebnisse und Interpretation
 - 4.1 Normalpatienten
 - 4.11 Zellbewegungen
 - 4.12 Markierungsverhalten
 - 4.13 Agglutinationseffekt
 - 4.14 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungs-
 verhaltens von Normallymphozyten unter PHA-Wirkung
 - 4.15 Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten
 - 4.2 Chronische lymphatische Leukämie
 - 4.21 Patient Hu.J.
 - 4.22 Patient R.A.
 - 4.23 Patient Hög.J.
 - 4.24 Patient S.W.
 - 4.25 Patientin K.C.
 - 4.26 Patient R.A. (Knochenmarkkulturen)
 - 4.27 Lymphozytenkinetik bei CLL-Patienten
 - 4.3 Lymphogranulomatose
 - 4.31 Patientin A.R.
 - 4.32 Patient Hög.A.
 - 4.33 Patient M.F.
 - 4.34 Lymphozytenkinetik bei Lymphogranulomatose-Patienten
 - 4.4 Vergleich der Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten,
 Chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranu-
 lomatose
 - 4.5 Das T-Zellcompartment
 - 4.51 Normalpatienten
 - 4.52 Chronische Lymphadenose
 - 4.53 Lymphogranulomatose
 - 4.54 Diskussion
 - 4.6 Immunkinetik

5. Diskussion pathomechanischer Zusammenhänge bei der Chronischen lymphatischen Leukämie und der Lymphogranulomatose
 - 5.1 Die normale Physiologie der lymphatischen Reihe
 - 5.2 Pathophysiologische Mechanismen bei der Chronischen lymphatischen Leukämie
 - 5.3 Pathophysiologische Mechanismen bei der Lymphogranulomatose
6. Zusammenfassung
7. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Im Verlauf der letzten zwanzig Jahre konnte in einer Reihe von Studien gezeigt werden, daß die Lymphozyten sowohl die Produzenten der Immunglobuline als auch die Aktionszellen der "cutanen" zellulären Immunreaktion stellen. Ihre Aktivität wurde durch Ansätze in vitro unter Stimulation von Mitogenen (z.B. Phytohämagglutinin PHA) überprüfbar.

Gegenüber Normalpersonen sind lymphoproliferative Erkrankungen durch immunologische Defekte ihrer Lymphozytenpopulationen gekennzeichnet. Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, das Umsatzverhalten der PHA-reaktiven Zellen bei chronischer Lymphadenose sowie bei Lymphogranulomatose in Abgrenzung gegenüber Normalpersonen zu charakterisieren. Einleitend soll auf folgende Punkte eingegangen werden:

- 1.1 Lymphozytenpopulationen
- 1.2 Wirkung des Phytohämagglutinins
- 1.3 Chronische lymphatische Leukämie und Lymphogranulomatose mit Einschränkungen der PHA-Stimulierbarkeit der Lymphozyten
- 1.4 Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten, Patienten mit chronischer Lymphadenose sowie mit Lymphogranulomatose
- 1.5 Ziele der vorliegenden Untersuchung.

1.1 Lymphozytenpopulationen

1.11 B-Lymphozyten: in den Tierexperimenten von SELL und GELL (186) wurde erstmals deutlich, daß ein Teil der Lymphozyten Immunglobuline an seiner Oberfläche

trägt. JNANDE und andere (220) zeigten, daß diese Zellen zur "Bone marrow Derived" Reihe gehören, entsprechend also entweder aus dem Knochenmark oder aus bursähnlichen lymphatischen Organen stammen.

Bei Vögeln leiten sich diese Lymphozyten von der Bursa Fabricii ab (100), einem kloakennahen lymphoepithelialen Organ des Enddarms, das auch als kloakaler Thymus bezeichnet wird und sich analog dem Thymus mit Einsetzen der Geschlechtsreife bei diesen Tieren zurückbildet. Deshalb werden diese Zellen unter dem Arbeitstitel B-Lymphozyten beschrieben.

Über die Natur der bursähnlichen lymphatischen Organe des Menschen besteht übrigens noch Unklarheit. Wahrscheinlich handelt es sich um lymphatische Strukturen des Darms, möglicherweise die Peyer'schen Plaques des Ileums.

Beim gesunden Menschen finden sich in fluoreszenzmikroskopischen oder autoradiographischen Analysen 22 - 36 % der Lymphozyten mit Oberflächen-Immunglobulin-Besatz (100), sind also B-Lymphozyten.

Die B-Lymphozyten sind als Vorstufen der immunkompetenten Plasmazellen anzusehen und somit die elementaren Faktoren der spezifischen humoralen Abwehr. Sie finden sich in den peripheren lymphatischen Organen, vorzugsweise in den Keimzentren der Lymphknotenrinde, in denen auch die immunkompetenten Plasmazellen entstehen.

Die B-Lymphozyten zirkulieren im übrigen in geringerem Umfang als die T-Zellen. Ihre Lebensdauer schwankt zwi-

schen einigen Tagen und mehreren Monaten; die Majorität ist jedoch kurzlebig.

1.12 T-Lymphozyten: die übrigen zwei Drittel der Lymphozyten ohne quantitativ ins Gewicht fallenden Oberflächen-Globulin-Besatz leiten sich von Stammzellen ab, die nach Einwanderung in den Thymus ihre funktionelle Reife erlangen (150, 181), und werden daher als T-Lymphozyten bezeichnet.

Von diesen T-Zellen, die sich auch im Thymus vermehren, gehen viele noch in diesem Organ zugrunde, andere wandern ins periphere Blut aus und siedeln sich in den sogenannten peripheren lymphatischen Organen (Lymphknoten, lymphatisches Gewebe des Darms, Milz) ab. Hier in der Peripherie kommen die T-Lymphozyten wesentlich in den Malpighischen Körperchen der Milz und zwischen Rinde und Mark der Lymphknoten zu liegen.

Auf Antigenreiz wandeln sich die T-Zellen in große Blastenzellen um und geben eine Reihe von Faktoren, die "Lymphokine" (227), ab, die die klassische zelluläre Reaktion vom verzögerten Typ auslösen (50), bei der sie selbst in zytolytische Zell-zu-Zell-Interaktionen eintreten, wie sie etwa die Transplantatabstoßung und die Graft-versus-host-Reaktion charakterisiert (11).

Die T-Lymphozyten sind also die wesentlichen Träger der spezifischen zellulären Immunantwort.

Daneben regulieren die T-Zellen als Helferzellen zum Teil auch die B-Zellaktivität (78). In vitro läßt sich die Umwandlung der T-Lymphozyten in Blasten durch un-

spezifische Mitogene auslösen. So sind drei Tage nach Zusatz des Pflanzenproteins PHA 50 - 80 % zu Blasten transformiert.

Eine weitere spezifische B-Zell-Eigenschaft ist die Anlagerung von Schäferythrozyten, die so ohne vorherige Sensibilisierung Spontanrosetten um einen T-Lymphozyten bilden (38, 39).

Die T-Lymphozyten bilden außerdem den wesentlichen Anteil des rezirkulierenden Pools der kleinen Lymphocyten. Während ihres mehrjährigen Lebens wandern sie mehrmals über Blut- und Lymphbahnen zwischen den sekundären lymphatischen Organen und den übrigen Geweben hin und her. Eine entscheidende Aufgabe dürfte ihnen wahrscheinlich bei der Überwachung von Fremdatigenen zukommen.

1.13 Interaktionen zwischen T- und B-Populationen: Interaktionen dieser beiden Zellsysteme sind mannigfach beschrieben (78, 87, 227). Im wesentlichen handelt es sich dabei um eine Regulation der B-Zellaktivität durch T-Zellen, bei der möglicherweise die Abgabe IgM-artiger Moleküle eine Rolle spielt (62). Bei dieser Interaktion sind aber auch die Histokompatibilitätsantigene wichtig, denn wenn die Zellreihen nicht syngene sind, erfolgt keine Kooperation.

Der Ablauf von Immunreaktionen wird ferner durch Anreicherung des Antigens an Monozyten-Makrophagen gefördert. Die Einwanderung und Aktivierung dieser Zellen wird wieder durch Faktoren begünstigt, die von sensibilisierten Lymphocyten gebildet werden (48).

Den Aktionsablauf in diesem 3-Zellsystem faßten CIAMAN und MOSIER (34) in folgendem Modell zusammen: ein bestimmter Makrophagentyp sammelt antigene Trägermoleküle und Haptene an seiner Oberfläche: durch diese "verlockende" Präsentationsart werden passierende spezifische T-Lymphozyten gebunden und zur Teilung und vermehrten Synthese von Rezeptoren veranlaßt. Diese begünstigen eine weitere Bindung von Antigen-Hapten-Komplexen. An den Haptenteil lagern sich nun B-Zellen an, und es liegt schließlich ein "Cluster" von Makrophage, T- und B-Zelle vor. Die B-Zelle wird so aktiviert, teilt sich, verläßt diesen Cluster und sezerniert haptenspezifische Antikörper.

1.14 Zusammenfassung: B-Lymphozyten sind also die wesentlichen Träger der spezifischen humoralen, T-Lymphozyten die der spezifischen zellulären Immunantwort. Beide Lymphozytenpopulationen zeigen in der beschriebenen Weise auch Interaktionen.

Auf wirksamen Antigenreiz entstehen aus T- oder B-Zellen im lymphatischen Gewebe Blasten. Aus den T-Immunoblasten gehen zahlreiche antigenspezifische kleine Lymphozyten hervor. Die B-Immunoblasten proliferieren über Zwischenzellen zu immunkompetenten Plasmazellen.

Gleichzeitig kommt es in beiden Populationen zur Bereitstellung eines größeren Klons immunkompetenter Zellen, sogenannter memory-cells, die in Reserve bleiben. Bei erneutem Antigenkontakt ist dann eine verstärkte Immunreaktion möglich. Dies geschieht in der T-Population über einen Transferfaktor, der von antigenstimulierten T-Zellen gebildet, nicht antigenstimulierte T-Zellen

Für das betreffende Antigen in spezifischer Weise reaktionsbereit macht. In der B-Zyklus-Klonierung ist die Entstehung der memory-cells unklar. Einen Transfektorklon gibt es hier wahrscheinlich nicht. Wahrscheinlich proliferiert nur ein Teil der Tochterzellen der B-Klone zu immun-kompetenten Plasmazellen, der Rest bleibt in Reserve.

1.2 Wirkung des Phytohämagglutinins (PHA)

Eine Transformation und Proliferation kleiner Lymphozyten ist nicht nur *in vivo* möglich, sondern kann durch Zusatz von PHA auch in der Kultur - also *in vitro* - induziert werden (145).

Dies läßt sich auch durch andere Substanzen erreichen, durch spezifische, z.B. Pilz-, Bakterien- und Virusantigene, sowie durch weitere, wie das PHA, unspezifische Antigene, z.B. Pokeweed-Mitogen (PWM), Streptolysin S und andere.

PHA ist ein pflanzlicher Wirkstoff aus der roten Nierenbohne *Phaseolus vulgaris*. Beim mitogenen Prinzip des PHA handelt es sich um eine proteinfreie Substanz, die keine hochmolekularen Nukleinsäuren enthält (75).

Bei der Lymphozytentransformation wandelt sich eine stoffwechsel- und teilungs-inaktive Zelle in eine stoffwechsel- und teilungs-aktive blastenartige Zelle um. Diese Umwandlung wird wahrscheinlich durch metabolische Prozesse ausgelöst, die in der Anfangsphase der Stimulierung wirksam werden.

Sofort nach Zusatz zur Kultur lagert sich PHA an die Lymphozytenzellmembran an, wobei die Natur der PHA-Rezeptoren an der Zellmembran nicht geklärt ist.

Bei dem Rezeptor der erythrozytenagglutinierenden Komponente des PHA handelt es sich um ein Glykopeptid (119, 120, 121). Die Bindungsspezifität beruht auf dem Galaktoseanteil einer verzweigten Oligosaccharidkette, die die terminale Sequenz Sialinsäure - Galaktose - N-Acetylglucosamin besitzt. Diese Substanz hemmt im übrigen die durch PHA induzierte Lymphozytentransformation.

Wird allerdings die Galaktose abgespalten, so gehen mehr als 90 % dieser Hemmaktivität verloren. Daraus folgert nun BRITTINGER (22), daß die Bindung der mitogenen Komponente des PHA an die Lymphozytenmembran über ein Oligosaccharid erfolgt, dessen Struktur dem an der Erythrozytenoberfläche lokalisierten biologisch aktiven Rezeptoranteil ähnlich ist.

Einmal an die Lymphozytenmembran gebunden, verändert das PHA die Eigenschaften dieser Membran derart, daß die Zellen eine veränderte elektrophoretische Beweglichkeit (222) und außerdem eine erhöhte Aufnahme von Alphaaminoisobuttersäure zeigen (139). Daneben kommt es zu einer schnellen Steigerung des Phospholipidstoffwechsels der Zellmembran (65, 110). Etwa eine Stunde nach PHA-Zusatz zur Zellkultur kann man eine erhöhte Kaliumaufnahme in die Lymphozyten nachweisen (159). Sehr wahrscheinlich spielt also auch die Natrium-Kalium-Pumpe bei der Zellaktivierung eine Rolle.

Kurze Zeit nach Zugabe von PHA zu Lymphozytenkulturen konnte außerdem eine aktive Pinozytose beobachtet werden (95). Während der Initialphase der Aktivierung stellt sich etwa gleichzeitig mit der Pinozytose eine zunehmende Brüchigkeit der Lysosomenmembran ein, wobei

die Lysosomenlabilisierung wahrscheinlich in einem Kalziumzusammenhang mit der gesteigerten Pinocytose steht (12). Bei der Pinocytose entstehen vorerst unvollständige von einer Membran umschlossene Vakuolen. Ein Teil dieser Vakuolen vereinigt sich im Zellplasma mit präexistierenden Lysosomen. Die Membran der so entstehenden sekundären Lysosomen zeigt offensichtlich eine höhere Stabilität als die Membran primärer Lysosomen (36).

Außer den Membranveränderungen zeigen sich bereits innerhalb der ersten Stunde nach PHA-Zugabe auch Veränderungen am Zellkern. Die Phosphatgruppen der DNS binden in verstärktem Maße Berlin-Orange (111). Es kommt zu einer Acetylierung argininreicher Histone (154). Außerdem beobachtet man eine gesteigerte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Nukleoproteinen (115). Die rNS-Synthese ist gesteigert (42, 107). Die erhöhte rNS-Synthese zeigt sich auch in einer gesteigerten Template-Aktivität der DNS für rNS-Polymerase (96). Die neusynthetisierte rNS besteht aus einem polydispersen Anteil, ribosomaler Präkursor-rNS (45 S) und ribosomaler rNS (r rNS 18 und 28 S) (43, 169).

In PHA-stimulierten Lymphozyten kommt es außerdem zu einer erheblichen Steigerung der Proteinsynthese. Diese setzt innerhalb der ersten zwei bis drei Stunden nach PHA-Zugabe ein (109). Es kommt zu dieser Steigerung der Proteinsynthese auch dann, wenn die Anhäufung neuer Ribosomen durch Actinomycin verhindert wird (111). Wahrscheinlich steigert also PHA die Aktivität von bereits in ruhenden Lymphozyten vorhandenen Ribosomen.

Erst in einer wesentlich späteren Phase der Stimulierung kommt es zu einer Vermehrung der Lysosomen (4, 93, 151), einer Neusynthese und/oder Aktivierung eigener lysosomaler Enzyme (94, 118) und zu einer Steigerung der DNS-Synthese (136, 156) mit anschließender Mitose.

Für die DNS-Veränderungen sind wahrscheinlich dieselben lysosomalen Enzyme verantwortlich, die durch das vorstehend erwähnte Brüchigwerden der Lysosomenmembranen in die Lage versetzt werden, sich mit ihren spezifischen Substraten umzusetzen (96).

Welche beschriebenen Einzelveränderungen für die Proliferation der kleinen Lymphozyten maßgebend sind, liegt bis heute im Dunkeln.

Entweder gelangen durch die an der Zellmembran eintretenden Stoffwechselveränderungen dort gebildete oder freigesetzte Substanzen zum Zellkern und werden an ihm in dem Sinne wirksam, daß sie DNS-Abschnitte, die in ruhenden Lymphozyten inaktiv waren, enthemmen. Es würden dann der Zelle neue genetische Informationen zur Verfügung stehen.

Oder es kommt lediglich zu einer Aktivitätssteigerung bereits aktiver DNS, was zu einer erhöhten Transskriptionsfrequenz Anlaß gibt (sogenannte Modulationshypothese nach COOPER (43)).

RNS-DNS-Hybridisierungsversuche von TORELLI und anderen (212) lassen die Modulationshypothese wahrscheinlicher erscheinen als die konzentrierte Desoxyribosetheorie.

Im Rahmen der Modulationshypothese entspricht das Immunprodukt der aktivierten Zelle natürlich dem der ruhenden Zelle. Für das Auftreten neuer Proteine in stimulierten Zellen müssen dann Vorgänge ursächlich sein, die nicht von einer Gentranskription abhängen.

Wie die beschriebenen Einzelwirkungen des PHA an der Zelle ineinandergreifen und welche PHA-induzierten Veränderungen schließlich für die Transformation der kleinen Lymphozyten maßgeblich sind, ist wie schon ausgeführt unklar. Schlußendlich jedenfalls entstehen durch PHA-Stimulierung - wie bei Stimulierung durch spezifische Antigene - aus kleinen Lymphozyten blastenartige Zellen, die morphologisch den Immunoblasten entsprechen und wie diese nur wenig Ergastoplasma aufweisen. Vor allem T-Lymphozyten setzen sich in Gegenwart von löslichem PHA zu Blasten um (78).

Bei Normalpatienten findet sich drei Tage nach PHA-Zusatz ein hoher Prozentsatz von Immunoblasten im Kultur-
ausstrich. Diese Immunoblasten weisen analog den Untersuchungen von SCHEURLEN und anderen (175) einige morphologische Besonderheiten auf.

Sie enthalten, wie bereits beschrieben, wenig Ergastoplasma. Das Zytoplasma ist stark basophil und zeigt einzelne grobe Vakuolen. Es finden sich unregelmäßige Zellgrenzen bedingt durch Zytoplasmafortsätze, die durch die Motilität der Zellen oder aber durch die Aufnahme von Antigenen bedingt sein könnten. Der vergrößerte Zellkern weist meist 1 - 3 Nucleoli auf. Sein Chromatingerüst ist etwas feiner, aber auch unregelmäßiger als in normalen Lymphozyten.

Abschließend sei noch nachgetragen, daß sich schon zwei Stunden nach PHA-Zugabe Lymphozytenagglutinate im Kulturausstrich nachweisen lassen, das heißt, die Lymphozyten lagern sich zu Zellinseln zusammen. Wie der Vergleich mit nicht PHA-stimulierten Nullkulturen, in denen sich wenn überhaupt nur kleine wenige Zellen umfassende Inseln nachweisen lassen, zeigt, ist diese Bildung von Zellagglutinaten eindeutig ein PHA-Effekt.

Schematische Zusammenfassung der Wirkungen des PHA in Lymphozytenkulturen (nach BRITTINGER (22)):

<u>Zeit nach Zusatz von PHA zur Kultur</u>	<u>Zellveränderungen durch die PHA-Wirkung</u>
Sofort	Anlagerung von PHA an die Lymphozytenmembran
5 - 15 Minuten	Änderung der elektrophoretischen Beweglichkeit der Zellen
	Erhöhte Aufnahme von Alphaamino- isobuttersäure

Schnelle Steigerung des Phospholipidstoffwechsels der Zellmembran

Aktive Pinozytose

In Zusammenhang mit dieser Pinozytose Beginn der Labilisierung der Lysosomenmembranen

Verstärkte Bindung von Acridin-Orange an die Phosphatgruppen der DNS

Acetylierung argininreicher Histone

Gesteigerte Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Nukleoproteinen

30 - 120 Minuten

Weitere Labilisierung der Lysosomenmembranen

Erhöhte Template-Aktivität der DNS für die RNS-Polymerase

Steigerung der RNS-Synthese

Gesteigerte Kaliumaufnahme in Lymphozyten

2 - 6 Stunden

Zunahme der Proteinsynthese

Bildung von Lymphozytenagglutinaten

24 - 72 Stunden	Zunahme der Lysosomenzahl
	Aktivitätssteigerung und/oder Neusynthese lysosomaler Enzyme
	Steigerung der DNS-Synthese
	Entstehung von Immunoblasten

1.3 Chronische lymphatische Leukämie und Lymphogranulomatose mit Einschränkungen der PHA-Stimulierbarkeit der Lymphozyten

In diesem Zusammenhang ist zunächst die Erwähnung wichtig, daß es sich bei der Chronischen lymphatischen Leukämie und bei der Lymphogranulomatose um pathologische Vorgänge handelt, die in unterschiedlichen Lymphozytenpopulationen ablaufen.

1.31 Chronische lymphatische Leukämie: die chronische Lymphadenose kann als Leukämie der B-Lymphozyten angesprochen werden. Bei den meisten Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie finden sich bei den Blutlymphozyten vorwiegend Zellen mit Immunglobulindeterminanten an der Zelloberfläche (100). Wie bereits erwähnt, gehören diese Zellen zu der "bone marrow derived" Reihe, stammen also entweder aus dem Knochenmark oder aus bursaäquivalenten Organen (220) und sind somit Zellen, die unter dem Arbeitstitel B-Lymphozyten beschrieben werden.

Unterschiede bestehen hinsichtlich von Art und Dichte der Immunglobulindeterminanten an CLL-Lymphozyten.

Manst lassen sich Determinanten der IgG- und IgM-Klasse nachweisen (100). Bei manchen Patienten weist das IgM Antikörpereigenschaften gegen IgG auf, verhält sich also wie ein mannigfaltigartiges Autoantikörper (102).

An sehr vielen Leukämischen Zellen lassen sich schwere Ketten mit Antigeneigenschaften von IgD nachweisen (113, 154, 167). Eine klonale Herkunft der Lymphadenose-Lymphozyten legt die Tatsache nahe, daß die monoklonalen Immunglobuline auf den Zellen eines Patienten nur einer Leichte- und Schwerekettenklasse angehören.

Die Vermehrung der B-Lymphozyten nach der PHA nicht eine relative Verminderung von T-Lymphozyten nach sich (40, 70, 140, 166, 183). Dies ließ sich durch Auswertung von Spontanrosetten mit der PHA-Reaktionsfähigkeit nachweisen. Außerdem findet sich ein verzögertes Maximum der PHA-abhängigen Transformation (98, 187). Im übrigen ist die Funktion der T-Lymphozyten in vitro offensichtlich ungestört (140, 209), es sei denn, sie waren durch eine medikamentöse Therapie negativ beeinflusst. Demzufolge ist natürlich auch die zelluläre Immunität, jedenfalls bei vielen Lymphadenosepatienten, weitgehend ungestört.

Lymphadenoselymphozyten weisen Merkmalsdefekte auf. Sie zeigen eine erniedrigte Teilungsaktivität (207). In charakteristischen Fällen liegt eine unzureichende Entwicklung zu immunglobulinproduzierenden Zellen vor. Wie ausgeführt, ist aber die Produktion von Immunglobulinen die klassische Aufgabe der B-Lymphozyten sukzessive der aus ihnen hervorgehenden Plasmazellen. Bei der pathologischen Zellvermehrung im Rahmen der chronischen lymphatischen Leukämie spielt möglicherweise eine Störung der

Differenzierung langlebiger B-Zellen zu Plasmazellen mit kurzer Halbwertszeit in Kombination mit einer Rezirkulationsstörung eine wesentliche Rolle (100). Demgemäß kann die chronische lymphatische Leukämie entsprechend den Ausführungen JAMESHEKS (47) als eine akkumulative Erkrankung funktionell mangelhafter B-Lymphozyten aufgefaßt werden.

CLL-Lymphozyten zeigen also einige biochemische und morphologische Besonderheiten. Drei Tage nach PHA-Zusatz zeigt sich meist keine wesentliche Lymphozytentransformation (20, 21, 169). Statt dessen kommt es bei einem Teil dieser Zellen zu einer Spättransformation mit einem Höhepunkt nach fünf bis sieben Tagen (88). Bei Patienten mit niedrigen Blutlymphozytenzahlen findet man eine höhere Frühstimulierung als bei solchen mit starker peripheren Lymphozytose. Bei der CLL haben wir also nicht nur pathologische Lymphozyten, die mit PHA nicht oder nur geringfügig reagieren, sondern offensichtlich auch einen Restpool normaler Zellen, dessen Umfang unterschiedlich ist (169).

Warum die CLL-Lymphozyten vermindert und verzögert auf PHA ansprechen, ist nicht ganz klar. Bekannt ist, daß PHA in CLL-Lymphozyten genauso wie in Normallymphozyten schon früh zu einer Steigerung der RNS-Synthese Anlaß gibt. Allerdings kommt es erst am siebenten Versuchstag zu einer ausreichenden Synthese von r RNS (28 und 18 S) und einer verstärkten Ribosomenbildung (169). Möglicherweise hängt also die reduzierte Proliferationsbereitschaft der CLL-Lymphozyten mit einer verminderten r RNS-Synthese zusammen. Unbekannt ist, ob diese Störung von einer unzureichenden Bildung ribosomalen Proteins abhängt.

CLL-Lymphozyten enthalten im übrigen auch weniger Sialinsäure und eine geringere Zahl sialinsäurehaltiger PHA-Rezeptoren als normale Zellen (120). Aus dieser Membranveränderung resultiert eine verminderte Bindung von PHA an die Lymphozyten. Sehr wahrscheinlich bleibt an CLL-Lymphozyten mit vermindelter Phalloidin-Bindung auf PHA die Bruchigkeitszunahme der Lysosomenmembranen aus (120). Ob Grundlage dieser Störung eine wiederum durch die verminderte PHA-Bindung an die Zellmembran ausgelöste reduzierte Pinozytose ist, ist bislang ungeklärt.

1.72 Lymphogranulomatose: Im Gegensatz zur chronischen lymphatischen Leukämie ist die Lymphogranulomatose eine lymphatische Systemerkrankung unter gleichzeitiger Beteiligung von T- und B-Lymphozyten, wobei die T-Zellen stärker betroffen scheinen. Die Lymphogranulomatose wird auch definiert als lymphatische Neoplasie durch Auftreten tumorassoziierter Antigene sowie einer gegen diese Antigene gerichteten Abwehrreaktion (148).

Es finden sich Lymphozytenfunktionsstörungen unterschiedlicher Provenienz besonders bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien. Die in diesen Stadien nachweisbare Lymphopenie geht nicht selten mit erhöhter DNS-Synthese in Blutlymphozyten einher, weshalb auf eine gesteigerte Neubildung geschlossen wurde (176). Der gesteigerte Umsatz von Blutlymphozyten läßt sich eventuell als Verbrauch zirkulierender Zellen im Verlauf von Abwehrreaktionen deuten. ORDER und andere (148) wiesen beim Morbus Hodgkin tumorzellassozierte Antigene nach. Möglicherweise liegt das Gleichgewicht zwischen Tumor und Reaktion bei der lymphozytenreichen Form auf Seiten der Abwehr, weshalb sie prognostisch günstig ist, bei der rasch zum Tode führenden lymphozytenarmen Form auf Seiten der Tumorzellen (2).

Die höchsten DNS-Syntheseraten werden in aktiven Krankheitsstadien beobachtet (100). Im Generalisationsstadium wies SCHÖCK (176) mittels Vivomarkierung (^3H -Thymidin) einen erhöhten Lymphozytenumsatz nach. Ursache für die Lymphopenie bei erhöhter Proliferationsrate ist somit wahrscheinlich eine verminderte Lebensdauer zirkulierender Lymphozyten. Betroffen sind wohl vor allem T-Lymphozyten.

Besonders in den Stadien III und IV des Morbus Hodgkin, allerdings gelegentlich auch bei Frühfällen, ist die Blastentransformation der Blutlymphozyten nach Zusatz von PHA und anderen Mitogenen eingeschränkt (25, 89).

Bei manchen Fällen ist die Transformation unter PHA ähnlich geringgradig wie bei der CLL. Das Transformationsmaximum tritt meist ebenfalls verzögert auf (89). Trotz weitgehend normaler T-Zellzahlen kann aus Kulturuntersuchungen auf Funktionsdefekte der T-Zellen geschlossen werden, ein Ergebnis, das sich auch durch Allergieuntersuchungen stützen läßt. Im wesentlichen gilt dies für die Stadien III und IV.

Zellen von Patienten mit Anergie zeigen eine wesentlich geringere Reaktionsfähigkeit mit PHA in der Kultur als Zellen von Patienten mit erhaltener Hautreaktion. Bei Hodgkin-Patienten mit Erkrankungen des Respirationstraktes und anderen mikrobiologisch bedingten Komplikationen, insbesondere durch in der Regel wenig pathogene Erreger wie *Pneumocystis carinii*, Zytomegalievirus und *Candida albicans* hervorgerufene, konnten HUBER und andere (100) eine erhebliche Verminderung der PHA-Reaktionsfähigkeit der Lymphozyten in der Kultur beobachten.

Die Lymphogranulomatose ist also wesentlich durch eine drastische Verwinderung der zellulären Immunität gekennzeichnet. Störungen der Immunoglobulinsynthese sind seltener (181). Die PHA-Aktivierbarkeit ist meist deutlich herabgesetzt und korreliert mit einer Neutropenie (189). Die PHA-induzierte Lymphozytentransformation ist insbesondere bei generalisierter Erkrankung (Stadium III und IV) vermindert. In den Zellkulturen finden sich verhältnismäßig oft Makrophagen. Ihr Anteil ist umso größer, je geringer die Zahl der Immunoblasten ist (175).

1.4 Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten, Patienten mit chronischer Bronchialenose sowie mit Lymphogranulomatose

1.41 Normalpatienten: Das lymphatische Zellsystem setzt sich bei Normalpatienten zu ca. 90 % aus kleinen, zu 5 % aus mittleren und großen Lymphozyten sowie gleichfalls zu 5 % aus Plasmazellen zusammen.

Im peripheren Blut befinden sich etwa nur 2 % der Gesamtlymphozytenzahl. Dennoch transportiert das periphere Blut täglich ein Vielfaches seines Lymphozytengehaltes (214). pro Tag treten bis zu 10 Milliarden Lymphozyten ins Blut ein und verlassen es wieder. Sie stammen aus den verschiedenen lymphatischen Organen und dem Knochenmark. Die wenigsten dieser Lymphozyten sind neu gebildet; vielmehr stammen sie aus Lymphozytenspeichern - den lymphatischen Organen - und gelangen für eine Zirkulationszeit von ca. 30 Minuten kurzfristig ins Blut (45, 64, 68, 163, 176, 177, 178). Nach Verlassen des Blutes siedeln sie sich dann erneut Stunden bis Tage in den lymphatischen Geweben ab, um danach wieder ins Blut auszutreten, das heißt, sie rezirkulieren (76).

Der Pool der rezirkulierenden Lymphozyten ist ca. 25mal größer als der Pool der zirkulierenden Blutlymphozyten, und somit beträgt der Anteil der rezirkulierenden Lymphozyten an den im peripheren Blut befindlichen Lymphozyten etwa 90 % (17, 18, 64, 176). Wie bereits ausgeführt, setzt sich der Pool der rezirkulierenden kleinen Lymphozyten vorzugsweise aus T-Zellen zusammen.

Neben dem rezirkulierenden Pool besonders im Blut, der Lymphe, der Rinde der Lymphknoten sowie in der weißen Milzpulpa lokalisiert, existiert ein nach Schätzungen von TREPEL (214) etwa gleich großer Pool nicht rezirkulierender Lymphozyten in Knochenmark, Thymus, Lymphknotenmark und -keimzentren (68, 171). In diesem nicht rezirkulierenden Pool finden sich neben ortsständigen Lymphozyten auch ausschwemmungsfähige Zellen (16, 32, 76, 164). Diese Zellen rezirkulieren allerdings nicht.

Die Mehrzahl der täglich ins Blut eintretenden Lymphozyten ist also nicht neu gebildet, sondern stammt aus dem rezirkulierenden Pool. Täglich entstehen nur etwa 1 - 2 % der Blutlymphozyten neu (176, 177). Lediglich bei Kindern wird im Verlauf von akuten Immunreaktionen diese geringe Neubildungsrate übertroffen.

Die Lymphopoese läuft hauptsächlich in den Lymphknoten, der Milz und im Knochenmark ab (176). Und zwar entstehen durch mitotische Teilung von Immunoblasten große und mittlere Lymphozyten, durch deren Teilung kleine Lymphozyten. Letztere sind teilungsunfähig. Lymphatische Plasmazellen entstehen aus Plasmoblasten, die ihrerseits aus Immunoblasten hervorgehen (165).

Im Erwachsenenorganismus sind die Stammzellen der lymphatischen Reihe ruhende Zellen, die in den primären lymphatischen Organen durch antigenunabhängige (15, 17, 187), in den sekundären lymphatischen Organen durch antigenabhängige Reize zur Proliferation stimuliert werden (77). Dabei unterscheiden sich undeterminierte Stammzellen, aus denen jede Zelle der lymphatischen Reihe hervorgehen kann, sowie determinierte Stammzellen, deren Entwicklungspotenzen bereits soweit reguliert sind, daß sie meist nur einen einzigen, durch ein oder wenige Antigene stimulierbaren Zellklon aufbauen können. Die undeterminierten Stammzellen sind wahrscheinlich mit den pluripotenten Hämocytoblasten identisch (146, 217, 229). Sie stammen beim Menschen vermutlich aus der Knochenmark (10, 209). Die determinierten Stammzellen der Lymphopoese sind primär immunkompetente Lymphozyten: Lymphozytenkinetisch handelt es sich überwiegend um rezirkulierende Zellen (77, 200, 225).

Bei einem Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellabbau hängt die notwendige Flußstromrate undeterminierter Stammzellen in die Lymphopoese von der antigeninduzierten Transformationsrate der determinierten Stammzellen zu proliferierenden lymphatischen Zellen und deren Teilungsfrequenz im Proliferations- und Reifungspool ab (214). Unter steady-state-Bedingungen strömt allerdings ein außerordentlich geringer Teil von undeterminierten Stammzellen in die Lympho- und Plasmazytopoese ein. Im wesentlichen sind also die langlebigen determinierten lymphatischen Stammzellen die Hauptträger der Zellerneuerung im lymphatischen System.

Dadurch wird klar, weshalb auch nach der physiologischen Thymusinvolution, wodurch letztlich der weitere Einstrom von undeterminierten Stammzellen in die thymusabhängige T-Zellreihe unterbleibt, der Bestand der T-Zellen durch die Proliferation vorhandener determinierter Stammzellen für den größten Teil des Lebens nahezu konstant bleibt (29, 90, 196).

Üblicherweise unterscheidet man kurzlebige kleine, mittlere und große Lymphozyten mit einer Lebensdauer von 1 - 10 Tagen sowie langlebige kleine Lymphozyten mit einer Lebensdauer von mehreren hundert Tagen (26, 144, 149, 176, 177). Rasch umsetzende Lymphozytenpopulationen finden sich vorzugsweise im nicht rezirkulierenden Pool. Im peripheren Blut Erwachsener beträgt der Anteil rasch umsetzender Lymphozyten 10 %. Die eine Hälfte davon sind kleine, die andere Hälfte große und mittlere Lymphozyten (176, 177). Die langsam umsetzenden Lymphozyten finden sich vorzugsweise im rezirkulierenden Pool, in gewissem Ausmaß allerdings auch im nicht rezirkulierenden Pool. Im Blut machen sie etwa 90 % der lymphatischen Zellen aus, ihr Anteil an der gesamten Lymphozytenpopulation beträgt etwa 75 %. T-Lymphozyten setzen sich außerhalb des Thymus überwiegend langsam um (189, 196). Unter den B-Lymphozyten finden sich außerhalb des Knochenmarks sowohl schnell als auch langsam umsetzende Zellen (123, 189, 196).

Täglich werden Lymphozyten neu gebildet. Deshalb müssen natürlich ebenso viel Lymphozyten täglich aus dem lymphatischen Zellsystem entfernt werden. Physiologisch geschieht dies entweder durch Transformation in andere Zellen, z.B. in Immunoblasten, aus denen Plasmazellen

hervorgehen, oder durch Ausstrich in das Lumen des Pankreas-intestinaltraktes (122), oder aber durch Leittum in lymphatischen Gewebe, besonders in Thymus und in den Keimzentren (33, 114).

Ein intaktes lymphatisches System gleicht also unter physiologischen Bedingungen den Zelluntergang durch kontinuierliche Neubildung von Zellen der gleichen Art aus. Wir haben demzufolge bei Normalpatienten eine stationäre Lymphozytenkonzentration, ein Fließgleichgewicht zwischen Produktion und physiologischem Verlust oder Verbrauch.

Bei einer Störung dieses steady-state kommt es je nach Angriffspunkt entweder, wie bei der chronischen lymphatischen Leukämie, zu einer Lymphozytenvermehrung oder, wie bei der Lymphogranulomatose, zu einer Lymphozytopenie.

1.42 Chronische Lymphadenose: bei der chronischen Lymphadenose, und zwar der leukämischen Form, ist die tägliche Neuproduktion von Lymphozyten gegenüber den bei Normalpatienten gefundenen Werten um das 7 - 15fache erhöht. Auch bei Hodgkinpatienten findet man, freilich in geringerem Ausmaß, eine Steigerung der täglichen Neuproduktion von Lymphozyten, und zwar erstaunlicherweise besonders deutlich bei den stark lymphopenischen Formen.

Es kann also bei beiden Erkrankungen eine gesteigerte Blutlymphozytenproduktion auftreten. Trotzdem finden wir, wie schon erwähnt, bei der chronischen Lymphadenose eine leukämische Zellvermehrung, bei der Lymphogranulomatose eine Lymphozytopenie.

Die neu gebildeten Zellen bei der chronischen Lymphadenose bestehen zu 90 % aus kurzlebigen Lymphozyten, die eine Lebensdauer von 10 Tagen aufweisen. Dies entspricht in etwa den bei Normalpatienten gefundenen Werten. Allerdings sind bei der Lymphadenose die Produktionszahlen erheblich gesteigert, was bedeutet, daß die kurzlebigen Zellen an der Gesamtlymphozytenzahl einen erheblich größeren Anteil haben als bei Normalpatienten.

Zudem ist bei der chronischen lymphatischen Leukämie auch die Produktion der langlebigen Lymphozyten gesteigert, außerdem ihre Lebensdauer zusätzlich bis auf 5 Jahre erhöht. Dies muß zwangsläufig auf längere Sicht zu einer enormen Akkumulation auch dieser pathologischen Zellen führen.

Selbstverständlich lassen sich nicht gleich zu Beginn der Erkrankung massive Zellvermehrungen nachweisen. Vielmehr dürfte es im Verlauf des Krankheitsprozesses zu einer permanenten Ausweitung der Produktion kommen, was sich schlußendlich in einer beständig fortschreitenden Anhäufung pathologischer Zellen manifestiert.

Nach Untersuchungen von SCHICK (177) zeichnet sich die Umsatzkinetik der Blutlymphozyten bei der chronischen Lymphadenose durch drei Störungen aus:

1. Die Produktion langlebiger Zellen ist erheblich gesteigert.
2. Die mittlere Lebensdauer dieser Lymphozyten ist auf mindestens 5 Jahre verlängert.
3. Der Zustrom kurzlebiger Lymphozyten ist stark erhöht.

Die entscheidende Ursache für die massive Lymphozytose dürften dafür die Punkte 1. und 2. sein (177).

1.43 Lymphogranulomatose: zwar ist bei Morbus Hodgkin wie bei der Lymphknotenose die Produktion von Lymphozyten gesteigert, trotzdem besteht eine Lymphopenie. Wie vorstehend erwähnt, zeigen gerade ausgeprägte lymphocytopenische Formen eine besonders starke Neusyntheserate. Dies ist auf eine verminderte Lebensdauer der neu gebildeten Zellen zurückzuführen, die zwischen 1 - 5 Tagen liegt (177). Auf diese Weise resultiert eine Verminderung der Gesamtlymphocytenzahl, da das Fließgleichgewicht wegen der geringen Lebensdauer der neuen Zellen nicht aufrechterhalten werden kann.

Darüber hinaus werden bei der Lymphogranulomatose nur sehr wenige, eventuell - was allerdings bislang unklar ist - überhaupt keine langlebigen Lymphozyten ins periphere Blut abgegeben. Die Lebensdauer dieser langlebigen Zellen ist wahrscheinlich normal.

Gemäß SCHLICK (177) lassen sich auch beim Morbus Hodgkin drei Störungen der Umsatzkinetik lymphatischer Blutzellen nachweisen:

1. Der Zustrom langlebiger Zellen, deren Lebensdauer wahrscheinlich normal ist, ist zumindest bei ausgeprägter Lymphocytopenie drastisch vermindert.
2. Die Produktion kurzlebiger Zellen ist gesteigert.

3. Die Lebensspanne dieser Zellen ist im Vergleich zu kurzlebigen Lymphozyten bei Normalpatienten vermindert.

1.4 Zusammenfassung: Die entscheidende Störung der Lymphozytenkinetik bei der chronischen lymphatischen Leukämie besteht in einer gesteigerten Produktion langlebiger Zellen mit erhöhter Lebensdauer, was sich auf lange Sicht in einer massiven Lymphozytose äußert. Genau umgekehrt ist wesentlicher Störfaktor der Lymphozytenkinetik beim Morbus Hodgkin die reduzierte Produktion langlebiger Lymphozyten mit wahrscheinlich normaler Lebensdauer, was langfristig zu einer Lymphozytopenie führt.

1.5 Ziele der vorliegenden Untersuchung

Aufgabe der vorliegenden Untersuchung war es, das Umsatzverhalten der PHA-reaktiven Lymphozyten bei chronischer Lymphadenose sowie bei Lymphogranulomatose in Abgrenzung gegenüber Normalpersonen zu beurteilen.

Wir untersuchten zunächst das kinetische Verhalten der Lymphozyten der einzelnen Patientenkollektive unter PHA in vitro. Anhand der gefundenen Ergebnisse errechneten wir unter Korrelation von in vitro- und in vivo-Befunden die Größe des T-Zellcompartiments bei den einzelnen Krankheitsbildern und beurteilten schließlich immunkinetisch den Charakter der transformierenden T-Zellen.

2. Material und Methode

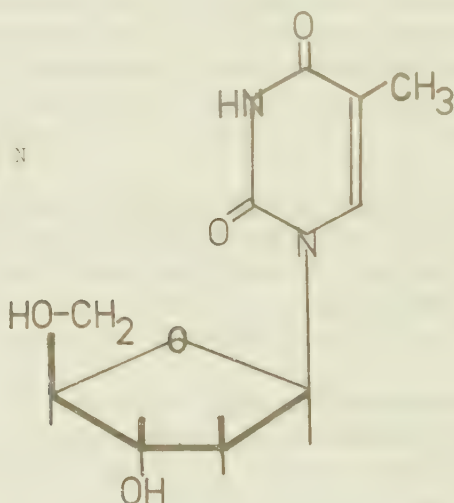
2.1 Markierungsverfahren:

Zur Vivomarkierung verwendeten wir unter Beachtung der Strahlenschutzvorschriften das Isotop ^3H -Thymidindesoxyribosid (Radiochemical Centre Amersham) mit der spezi-

fischen Aktivität 5 Ci/mM. Dieses Isotop entsteht durch Einbau von radioaktivem Wasserstoff (Tritium) in das Nucleosid Thymidin. Tritium ist ein Betastrahler. Die Aktivität ist gering, ebenso die Reichweite der Strahlung. Mit 12,5 Jahren ist allerdings die Halbwertszeit beträchtlich.

Das Vorkommen von Thymidin ist typisch für die DNS. Ribonucleinsäuren enthalten statt dessen Uridin.

T H Y M I D I N



Man hätte für die Markierung auch radioaktives Cytisin verwenden können. Dies findet sich allerdings auch in der RNS. Zudem haben quantitative Analysen gezeigt, daß bei den meisten Tieren und auch beim Menschen mehr Adenin + Thymin (Adenosin + Thymidin) als Guanin + Cytosin (Guanidin + Cytidin) vorliegt. Das Molverhältnis der Basenpaare beträgt 1,3 - 1,5. Somit ist radioaktives Thymidin für die Markierung geeigneter.

Das spezifische Vorgehen bei jedem einzelnen untersuchten Patienten - Dauer der Markierung, Art der Markierung (Infusion, flash-injection, subkutane Applikation), Isotopenmenge in Mikrocuries/Körpergewicht, gesamte während der Markierung applizierte Isotopenmenge - unter 2.5 genau beschrieben.

2.2 Die PHA-Kultur

2.21 Verwendete Reagenzien:

2.211 Minimum Essential Medium (Grand Island): wir bewahrten die lachsrote Flüssigkeit in Kühlschrank auf und erwärmten sie jeweils vor Gebrauch, indem wir sie eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen ließen. Jeder neuen Flasche (Inhalt 100 ml, wurde 1 ml Penicillin-Streptomycin zugesetzt (1 ml = 1 % von 100 ml), um das Wachstum von Bakterien in der Lymphozytenkultur und damit deren Zerstörung zu verhindern.

2.212 Fetal Calf Serum (Grand Island): das Reagens wurde in der Kühltruhe aufbewahrt. Da sich im Fetal Calf Serum Substanzen befinden, die im Humanblut als Antigene wirksam sind, wurde das Reagens im Wasserbad 30 Minuten bei 56° Celsius vor Gebrauch erhitzt, um beim Anlegen der Lymphozytenkultur Antigen-Antikörperreaktionen und damit die Präzipitation von hochmolekularen Antigen-Antikörperkomplexen durch Inaktivierung der Antigene zu verhindern.

2.213 L-Glutamin 200 ml: dieses Reagens wurde ebenfalls in der Kühltruhe aufbewahrt.

2.214 Penicillin-Streptomycin: diese Antibiotikakombination fand wie unter 2.211 beschrieben Verwendung.

2.215 Phytohämagglutinin (Wellcome) PHA: wir verwendeten dieses unspezifische Aggins aus der roten Wickenbohne *Phaseolus vulgaris* zur Silicierung der Erythrocyten in der Kollur. Da die Substanz in Pulverform vorliegt, wuschen sie vor Gebrauch in destilliertem Wasser gelöst.

2.216 Liquemin (= Heparin): dieses Antikoagulum wurde benutzt, um bei der Blutabnahme eine Gerinnung des gewonnenen Blutes in der Spritze zu verhindern. Zu diesem Zweck verdünnten wir konzentriertes Liquemin mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1:10. Um 10 ml Blut angerinnbar zu machen, aspirierten wir nach Blutabnahme 0,2 ml dieses verdünnten Liquemins in die Spritze.

2.217 Flachägel: dieses bakterielle (bakteriell toxisches mesenterisches), allerdings pharmazeutisch veredelte, in physiologischer Kochsalzlösung gelöste Polysaccharid verwendeten wir, um in Fällen, in denen eine normale Blutsenkung zu erwarten war, die Blutsenkungsgeschwindigkeit zu beschleunigen und die Senkungszeit herabzusetzen.

2.22 Gewinnung der Leukozyten: wichtig ist hierbei wie auch bei allen nach folgenden Arbeitsschritten die Einhaltung strikter Sterilität. Zunächst entnahmen wir mit einer liqueminisierten Spritze Venenblut von der Versuchsperson. Dieses wurde dann in ein steriles Blutglas eingebracht. Wir ließen es in einem Inkubator bei 37° Celsius sedimentieren, bis sich das Plasma scharf von den Zellen abgegrenzt hatte.

Nach Abschluß der Blutsenkung pipettierten wir den Überstand d.h. die Leukozytensuspension, mit sterilen Pasteurpipetten

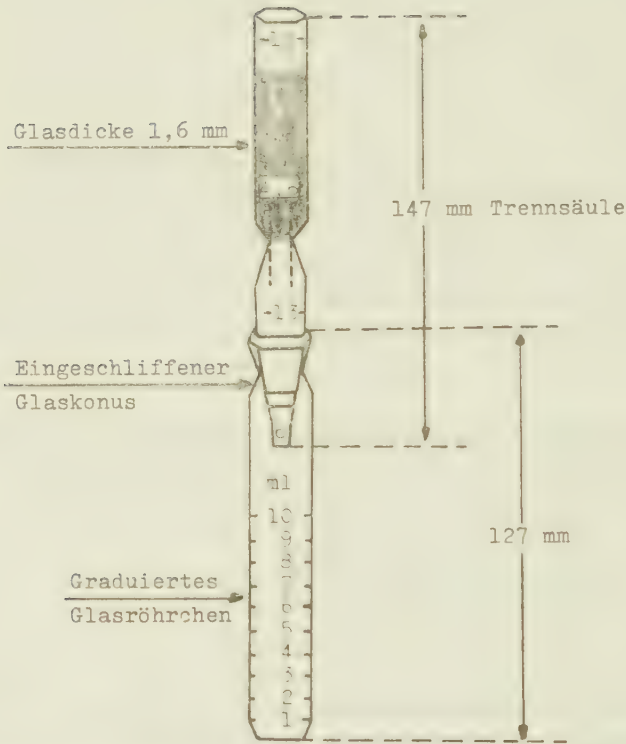
ab und füllten ihn in bereitgestellte Zentrifugengläser. Im Rahmen des ersten Waschvorganges wurde der Inhalt dieser Zentrifugengläser bei 27° Celsius und 1000 Umdrehungen pro Minute (1000 Upm) 10 Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die in den Zentrifugengläsern verbliebenen Zellen mit Minimum Essential Medium überschichtet. Nach Herstellung einer Leukozytensuspension durch Aufwirbeln der Zellen mittels einer sterilen Pasteurpipette schlossen wir zwei analoge Waschvorgänge an. Falls Plasmagel zur Beschleunigung der Blutsenkung verwendet worden war, wurde noch ein weiterer Waschvorgang durchgeführt, um dieses Dextran möglichst vollständig wieder zu entfernen.

Noch während der Waschvorgänge wurde komplettes Kulturmedium erstellt, das sich wie folgt zusammensetzt:

- 4 Teile Minimum Essential Medium
- 1 Teil Fetal Calf Serum
- 1 % der Gesamtmenge L-Glutamin

Nach Abschluß des letzten Waschvorganges und Verwerfen des Überstandes überschichteten wir das Leukozytensediment mittels einer Pasteurpipette mit etwas komplettem Kulturmedium, wirbelten es auf und gewannen auf diese Weise die trennbereite Leukozytensuspension.

2.23 Gewinnung der Lymphozyten: zur Trennung der Lymphozyten von den Granulozyten und Monozyten verwendeten wir folgende Versuchsanordnung:



Modell einer mit Leukopak (Nylonfasern) gefüllten Glassäule zur Abtrennung der Granulozyten und Monocyten von den Lymphocyten.

Nach Aufsetzen der sterilen, mit Leukopak gestopften Trennsäule auf ein graduiertes Röhrchen überschichteten wir wiederum mittels einer Pasteurpipette das Leukopak mit komplettem Kulturmedium und ließen dieses unter

leichtem Anheben der Säule aus dem Röhrchen heraus, um eine angemessene Geschwindigkeit bei der Flüssigkeitspassage zu erreichen, und unter Beklopfen der Säulenwand mit dem Finger, um eine möglichst gleichmäßige Passage der Flüssigkeit zu erzielen, so lange durch die Leukopakschicht passieren, bis der erste Tropfen Kulturmedium aus der Leukopakschicht ins graduierte Röhrchen fiel. Dann wurde durch festes Aufsetzen des eingeschliffenen Glaskonus auf das Röhrchen die Flüssigkeitspassage gestoppt, und das System stand für die Zelltrennung bereit.

Nunmehr pipettierten wir die bei den Waschvorgängen gewonnene Leukozytensuspension in die Trennsäule und inkubierten das mit abgeflamtem Staniolpapier verschlossene System 15 Minuten bei 37° Celsius im Brutschrank. Erst dann ließen wir die Leukozytensuspension wie beschrieben durch das Leukopak passieren und spülten mit komplettem Kulturmedium nach.

Nach Abschluß dieses Arbeitsganges wurde die Trennsäule aus dem System entfernt, das graduierte Röhrchen mit einem geschliffenen Glasstöpsel zur Erhaltung der Sterilität verschlossen und bis zur Kulturauslegung bei 37° Celsius im Brutschrank aufbewahrt.

Im Leukopak der Trennsäule blieben die großen Zellen der weißen Fraktion - die Granulozyten und Monozyten - hängen, während die kleineren Lymphozyten das Trennsystem passierten. Das graduierte Röhrchen enthielt also eine reine Lymphozytensuspension.

2.24 Anlegen der Lymphozytenkulturen:

2.241 Berechnung der Kulturen: zunächst zu festzustellen, wieviel Lymphozyten sich in der gewonnenen Suspension befinden.

Wir zogen dazu bis zum Teilstrich 0,5 einer Leukozytenpipette Lymphozytensuspension auf und saugten dann 1%ige Essigsäure an, bis die Flüssigkeit am Teilstrich 11 der Pipette stand.

In der Leukozytenpipette befinden sich dann 1 Teil = 0,5 Einheiten Lymphozytenkonzentrat und 21 Teile = 10,5 Einheiten 1%ige Essigsäure. Das heißt, das Lymphozytenkonzentrat ist 21fach verdünnt. Es gilt für die Verdünnung:

$$\frac{1 \text{ Teil Lymphozytenkonzentrat (0,5 Einheiten)}}{22 \text{ Teile Gesamtmenge (0,5 Einheiten Lymphozytenkonzentrat + 10,5 Einheiten CH}_3\text{COOH)}} = 1 : 22$$

Nachdem wir die Pipette auf einem elektrischen Rüttler 3 Minuten lang durchgeschüttelt hatten, verwarfen wir 0,5 Einheiten des Inhalts. Da sich im unteren Teil der Leukozytenpipette im wesentlichen natürlich nur Essigsäure befindet, wurden also 0,5 Einheiten Essigsäure verworfen.

Nach dem Verwerfen befinden sich in der Leukozytenpipette 1 Teil = 0,5 Einheiten Lymphozytenkonzentrat und 20 Teile = 10 Einheiten 1%ige Essigsäure. Das heißt, das Lymphozytenkonzentrat ist 20fach verdünnt. Es gilt für die Verdünnung:

$$\frac{1 \text{ Teil Lymphozytenkonzentrat (0,5 Einheiten)}}{21 \text{ Teile Gesamtmenge (0,5 Einheiten Lymphozytenkonzentrat + 10,0 Einheiten CH}_3\text{COOH)}} = 1 : 21$$

Dann brachten wir von der in der Leukozytenpipette befindlichen Flüssigkeit jeweils einen Tropfen auf die beiden freien Enden des mittleren Balkens einer vorbereiteten Neubauerzählkammer und ermittelten am Mikroskop im Dunkelfeld mit einem 40er Objektiv unter Benutzung einer Zähluhr die Lymphozytenzahl.

Bei der Zähltechnik in der Neubauerkammer verfahren wir wie folgt: wir gingen meranderartig durch die Felderflächen der Kammer und zählten die Lymphozyten in vier Felderflächen aus, und zwar jeweils in zwei einander diagonal gegenüberliegenden Felderflächen auf beiden Seiten des horizontalen Mittelbalkens.

Das weitere Vorgehen sei am Beispiel eines gesunden Probanden (Th. H.) erläutert. Wir fanden folgende Lymphozytenzahlen:



Aus diesen errechneten wir den Mittelwert:

$$29 + 26 = 55 : 2 = 27,5 = 28$$

$$29 + 35 = 64 : 2 = 32 = 32$$

$$28 + 32 = 60 : 2 = 30$$

In einer Felderfläche fanden sich also im Mittel 30 Lymphozyten.

Eine solche Felderfläche der Neubauerkammer hat folgende Abmessungen: Länge 1 mm, Breite 1 mm, Tiefe 0,1 mm. Sie hat demnach folgendes Volumen:

$$1 \text{ (mm)} \times 1 \text{ (mm)} \times 0,1 \text{ (mm)} = 0,1 \text{ (mm}^3\text{)}$$

Das heißt, in $0,1 \text{ mm}^3$ des zur Zählung mit Essigsäure verdünnten Lymphozytenkonzentrats fanden sich bei unserem Probanden 30 Lymphozyten. Um nun die Lymphozytenzahl in den 8 ml Lymphozytensuspension, die wir von diesem Probanden gewonnen hatten, zu ermitteln, geht man folgendermaßen vor:

In einer Felderfläche ($0,1 \text{ mm}^3$) befinden sich im Mittel 30, in zwei einander diagonal gegenüberliegenden Felderflächen ($0,2 \text{ mm}^3$) 60 Lymphozyten. In 1 mm^3 ($5 \times 0,2 \text{ mm}^3$) des zur Zählung verdünnten Lymphozytenkonzentrats finden sich demnach $60 \times 5 = 300$ Lymphozyten.

Nun wurde das Lymphozytenkonzentrat wie ausgeführt vor Einbringen in die Neubauerzählkammer mit 1%iger Essigsäure 20fach verdünnt. In 1 mm^3 unverdünnten Lymphozytenkonzentrat finden sich dann also $300 \times 20 = 6000$ Lymphozyten.

Da $1 \text{ ml} = 1000 \text{ mm}^3 = 1 \text{ cm}^3$ entspricht, haben wir in 1 ml unverdünntem Lymphozytenkonzentrat $6000 \times 1000 = 6 \text{ Millionen Lymphozyten}$.

In den 8 ml Lymphozytenkonzentrat unseres Probanden fanden wir also $6 \text{ Millionen} \times 8 = 48 \text{ Millionen Lymphozyten}$.

Allgemein gilt also für die Errechnung der Lymphozytenzahl in 1 ml Lymphozytenkonzentrat aus der in der Neubauer-kammer ermittelten Lymphozytenzahl folgende mathematische Formel:

$$\begin{aligned} &\text{Lymphozytenzahl in } 0,1 \text{ mm}^3 \times 10 (= 1 \text{ mm}^3) \times \\ &\times 20 (= \text{Verdünnung}) \times 1000 (= 1 \text{ cm}^3) = \\ &= \text{Lymphozytenzahl in 1 ml Lymphozytenkonzentrat} \end{aligned}$$

Jede unserer Kulturen umfaßte ein Volumen von 1 ml und enthielt 1 Million Lymphozyten. In unserem Fall hätten wir also 48 Kulturen ansetzen können, begnügten uns aber, da die Untersuchung in diesem speziellen Fall lediglich der Demonstration der Methode diene, mit 40 Kulturen. Wir benötigten also 40 ml Kulturmedium.

Diese setzen sich wie folgt zusammen:

48 Millionen Lymphozyten = 8 ml Lymphozytenkonzentrat

40 Millionen Lymphozyten = x ml Lymphozytenkonzentrat

$$x = \frac{40 \times 8}{48} = \frac{320}{48} = 6,6 \text{ ml Lymphozytenkonzentrat}$$

$$40 \text{ ml} - 6 \text{ ml} = 33,4 \text{ ml}$$

$$33,4 \text{ ml} : 5 = 6,68 \text{ ml} = 6,7 \text{ ml Fetal Calf Serum}$$

$$6,7 \text{ ml} \times 4 = 26,8 \text{ ml Minimum Essential Medium}$$

Also

6,6 ml Lymphozytenkonzentrat

6,7 ml Fetal Calf Serum (1 Teil)

+ 26,8 ml Minimum Essential Medium (4 Teile)

40,1 ml + 0,4 ml (= 1 %) L-Glutamin

Diese Berechnungen wendeten wir mit entsprechend anderen Zahlen bei allen von uns erstellten Kulturen an.

2.242 Erstellung der Kulturen: wir erstellten, soweit die Lymphozytenzahlen dies gestatteten, stets nicht nur PHA-stimulierte Kulturen, sondern auch nicht stimulierte Kontrollansätze. Dabei legten wir die stimulierten Kulturen nach Möglichkeit so breit an, daß jeden Tag geerntet werden konnte.

Wir gingen folgendermaßen vor: zunächst pipettierten wir in einen sterilen Erlenmeyerkolben das gesamte für den jeweiligen Ansatz berechnete Kulturmedium, im oben gegebenen Beispiel also 4,0 ml Lymphozytenkonzentrat + 0,7 ml Fetal Calf Serum + 26,3 ml Minimum Essential Medium = 40,1 ml + 0,4 ml L-Glutamin. Dann entnahmen wir nach Durchmischung, um eine gleichmäßige Verteilung der Lymphozyten zu erreichen, diejenige Menge Kulturmedium dem Erlenmeyerkolben, die für die Erstellung der nicht stimulierten Ansätze vorgesehen war, und brachten sie in ein weiteres steriles Gefäß ein.

Die im Kulturmedium im Erlenmeyerkolben verbliebenen Lymphozyten stimulierten wir dann durch Zugabe des Antigens Phytohämagglutinin. pro ml, das heißt pro Kultur, verwendeten wir 0,02% ml dieses Antigens. Befanden sich also z.B. im Erlenmeyerkolben 24 ml Kulturmedium, was 24 Millionen Lymphozyten entspricht, setzten wir mittels einer Mendel-Mantoux-Spritze 0,02% ml PHA x x 24 = 0,6 ml Phytohämagglutinin zu.

Die Kulturgläser wärmten wir im Brutschrank vor, um bei Einfüllung der Kulturen den Lymphozytenzerfall durch Kälte möglichst gering zu halten. In jedes vorgewärmte Kulturglas - ein kleines Standglas mit Schraubverschluß - brachten wir dann 1 ml Kulturmedium - je nach Beschrif-

tung stimuliertes bzw. nicht stimuliertes - und verschlossen die Gläser locker mit dem Schraubverschluß, um zu gewährleisten, daß die durch den Brutschrank strömenden Gase Sauerstoff (O_2) und Kohlendioxyd (CO_2) ständig Zutreten konnten.

Die so erstellten PHA-Kulturen und nicht stimulierten Kontrollansätze wurden dann auf einem Tablett in den Brutschrank eingebracht.

Um möglichst standardisierte Versuchsbedingungen zu erzielen, waren wir stets bemüht, diese Lymphozytenkulturen in vier Stunden - gerechnet vom Beginn der Blutsenkung bis zum Einbringen der gefüllten und locker verschlossenen Kulturgläser in den Brutschrank - zu erstellen.

2.243 Das Ernten der Kulturen: beim Ernten ist steriles Arbeiten nicht mehr erforderlich.

Wir gingen bei den Ernten folgendermaßen vor: die erste Ernte führten wir zwei Stunden nach Einbringen der Kulturen in den Brutschrank durch = Nullernte, was dem sogenannten Nulltag entspricht, die zweite Ernte 24 Stunden nach Einbringen der Kulturen in den Brutschrank und so fort. Es ergibt sich also folgender Ernteschlüssel:

1. Ernte = 2 h = 0. Tag
2. Ernte = 24 h = 1. Tag
3. Ernte = 48 h = 2. Tag
4. Ernte = 72 h = 3. Tag
5. Ernte = 96 h = 4. Tag
6. Ernte = 120 h = 5. Tag

- 7. Ernte = 144 h = 6. Tag
- 8. Ernte = 168 h = 7. Tag
- 9. Ernte = 192 h = 8. Tag
- 10. Ernte = 216 h = 9. Tag

Analog verfahren wir bei nicht stimulierten Kulturen. So breite Ansätze waren allerdings nicht immer möglich, ganz abgesehen davon, daß es häufig nicht gelang, die Zellen über den sechsten Tag hinaus am Leben zu erhalten.

Wenn wir aufgrund der Lymphozytenzahlen dazu gezwungen waren, die Kulturansätze schmäler zu halten, verzichteten wir zunächst auf die 8., 9. und 10. Ernte im stimulierten wie im nicht stimulierten Ansatz, dann auf die 2., 3. und 6. Ernte zunächst im nicht stimulierten, später im stimulierten Ansatz, schließlich ganz auf den nicht stimulierten Ansatz. Im Extremfall beschränkten wir den stimulierten Ansatz auf die wichtigen Ernten 1 und 4, in einem Fall sogar auf die Ernte 4.

Im konkreten Fall entnahmen wir dem Brutschrank die zur Ernte heranstehenden Kulturgläser, schüttelten sie auf und gossen den Inhalt in unsterile Zentrifugengläser. Dann brachten wir in die leeren Kulturgläser je 2 ml kalte physiologische Kochsalzlösung, schüttelten erneut auf und gossen den Inhalt in die entsprechenden Zentrifugengläser nach.

Diese wurden dann bei 1000 Umdrehungen pro Minute (Upm) und 4° Celsius 10 Minuten lang zentrifugiert. Dabei setzen sich die Zellen am Boden der Zentrifugengläser ab. Durch die Kälte werden alle in der Lymphozytenkultur ablaufenden biologischen Reaktionen zum Stillstand gebracht, so daß man eine Momentaufnahme der Zellen erhält.

Nach Abschluß des Zentrifugenganges wurde die in jedem Zentrifugenglas befindliche Flüssigkeit unter Einsatz eines zum optischen Vergleich mit 0,3 ml Wasser gefüllten Zentrifugenglases durch Abpipettieren mit einer Pasteurpipette auf 0,3 ml eingeengt. Danach wirbelten wir die am Boden des Zentrifugenglases liegenden Zellen mit Hilfe der gleichen Pasteurpipette auf und verteilten sie dadurch gleichmäßig in der im Glas befindlichen Flüssigkeit.

Wir beschickten dann eine Zytozentrifuge mit gesäuberten, entsprechend beschrifteten und mit zweifach gelochten saugfähigen Deckblättern beschichteten Objektträgern. Mittels Mendel-Mantoux-Spritzen brachten wir in ein Departement der Zytozentrifuge jeweils 0,1 ml der nochmals gut durchgewirbelten Zellsuspension.

Dann zentrifugierten wir bei 500 Umdrehungen pro Minute (Upm) 5 Minuten lang. Die so erstellten morphologischen Präparate wurden luftgetrocknet.

2.3 Die Autoradiographie

Für die Autoradiographie werteten wir die luftgetrockneten und in Methylalkohol fixierten Präparate mikroskopisch aus und teilten sie nach Gütekriterien ein. Als Qualitätsparameter legten wir dabei die Zellzahl, die Zellgüte und zusätzlich in PHA-stimulierten Präparaten die Zahl, die Größe sowie die Übersichtlichkeit von Zellagglutinaten - Zellinseln - zugrunde.

Nach dieser qualitativen Auswertung erstellten wir Präparatserien, wobei wir aus den besten Präparaten die für die morphologische Auswertung vorgesehenen Hauptserien zusammenstellten, die schlechteren für Probeserien verwendeten.

Die Probenserien dienten der Kontrolle der Schwärzung des auf den Präparaten befindlichen Filmmaterials durch die Beta-Strahlung des in den Lymphozyten eingebauten H^3 -Thymidins während der Expositionszeit.

Nach Erstellung der Serien wurden die Präparate in der Dunkelkammer mit Kodak Strippingfilm AA 10 beschichtet und in lichtundurchlässige schwarze Plastikkästen eingebracht. Diesen auf den Präparaten liegenden Film exponierten wir dann - unter ständiger Kontrolle des Erfolges mit Hilfe der Probenserien - 200 Tage der Beta-Strahlung des in die Lymphozyten eingebauten radioaktiven Materials. Nach dieser Zeit wurde der Film belichtet.

Wir färben die belichteten Präparate gemäß der panoptischen Färbung nach Pappenheim:

1. 5 Minuten May-Grünwalds Eosin-Methylenblau-Lösung
2. 2 Minuten Puffer für Giemsa-Lösung (pH 7,2).
Abkippen!
3. 10 Minuten Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung
(1 Tropfen auf 1 ml Puffer oder 1,5 ml auf 50 ml Puffer)
4. Mit destilliertem Wasser abspülen und lufttrocknen.

Die so behandelten Präparate werteten wir morphologisch aus.

2.4 Morphologische Auswertung

Wir verwendeten ein binokulares Zeiss-Mikroskop, und zwar zur Standardisierung der Versuchsbedingungen stets

das gleiche, und werteten die Präparate mit Hilfe eines
 Immersionsobjektive und Sehnermerokularen aus. Pro Prä-
 parat zählten und beurteilten wir im Mittel 1000 Zellen.

Wir unterschieden anhand des Zelldurchmessers und morpho-
 logischer Kriterien folgende Lymphozytentypen:

1. Kleine Lymphozyten bis $8,5 \mu$. Die Kerne der
 kleinen Lymphozyten sind rundlich bis bohnen-
 förmig, dicht strukturiert und relativ glatt
 begrenzt. Die Zellen besitzen nur sehr wenig
 blaßblaues Protoplasma.
2. Mittlere Lymphozyten bis 10μ . Sie unterschei-
 den sich von kleinen Lymphozyten - abgesehen
 vom Durchmesser - eigentlich nicht wesentlich.
 Sie besitzen meist etwas mehr Protoplasma.
3. Große Lymphozyten bis 13μ . Sie haben einen
 etwas größeren Kern als die kleinen und mitt-
 leren Zellen und besitzen in der Regel erheb-
 lich mehr Protoplasma, das meist noch blasser
 blau ist als das der vorgenannten Fraktionen.
 Bei einigen dieser Zellen finden sich Plasma-
 vakuolen und blastenähnliche Auflockerungser-
 scheinungen in der Kernstruktur.
4. Lymphoblasten größer als 13μ . Sie besitzen
 relativ wenig stark basophiles Zytoplasma,
 das einzelne, manchmal auch sehr viele grobe
 Vakuolen aufweist. Die Zellgrenzen sind durch
 Zytoplasmafortsätze unregelmäßig. Der Kern
 enthält 1 - 3 Nucleoli. Sein Chromatingerüst

ist etwas feiner, aber unregelmäßiger und stärker aufgelockert als bei den vorgenannten Fraktionen.

5. Als Pyknosen bezogen wir auch noch geschrumpfte zugrundegehende kleine Zellelemente in die Auswertung mit ein, soweit ihr lymphozytärer Charakter noch zu erkennen war.

Wir unterschieden bei der Auswertung frei liegende und in Agglutinaten, d.h. Zellinseln, befindliche Zellen, wobei letztere sich insbesondere in stimulierten Präparaten befanden.

Wenn sich unter den 1000 ausgewerteten Zellen weniger als 100 Lymphblasten fanden, führten wir eine Blastenergänzung auf 100 durch, um stets gleiche Bedingungen für die Errechnung des Immunblastenmarkierungsverhaltens zu schaffen.

Die Markierungsintensität wurde durch Auszählen der Körnchenzahlen jeder markierten Zelle ermittelt. Als echte Markierung gingen in den Markierungsindex und die Markierungsintensität nur Werte jenseits der Backgroundgrenze ein, jener geringen unspezifischen Hintergrundmarkierung für jede Zellfläche, die wir für jeden einzelnen Versuchstag individuell bestimmten. Sie lag bei unseren Ansätzen in der Regel bei etwa 10 Körnchen.

Aus den so erhaltenen Ergebnissen errechneten wir:

1. Den prozentualen Anteil der frei liegenden Zellen an der Gesamtzellzahl.

2. Den prozentualen Anteil der in Zellinseln liegenden Zellen an der Gesamtzellzahl.
3. Den prozentualen Anteil der einzelnen Lymphozytenarten an der Gesamtzellzahl.
4. Den Markierungsindex (in %) der Zellfraktionen.
5. Die markierten Zellen (kleine, mittlere, große etc. Lymphozyten) pro 1000 Kulturzellen.
6. Die mittlere Kornzahl (mean grain count) der einzelnen Zellfraktionen.

2.5 Untersuchte Patienten

2.51 Normalpatienten:

2.511 Patientin B.R.:

Diagnosen: Arterielle Hypertonie. Hyperlipoproteinämie Typ IV nach Fredrickson. Generalisierte Arteriosklerose. Apoplex.

Anamnese: bei der 65jährigen Patientin war seit 1963 eine arterielle Hypertonie bekannt. Des weiteren bestand als Risikofaktor für die Entwicklung einer Arteriosklerose eine Hyperlipoproteinämie Typ IV nach Fredrickson. Die Patientin erlitt am 20.5.1973 einen apoplektischen Insult und kam mit einer zunächst relativ diskreten neurologischen Symptomatik (mittelgradige Parese des rechten Armes, leichte Schwäche des rechten Beines) zur stationären Aufnahme. Im Verlauf von 10 Tagen entwickelte sich

das Vollbild einer Halbseitenlähmung mit Hemiplegie und Facialisparese rechts sowie motorischer und sensorischer Aphasie.

Klinischer Befund: bei der Patientin bestand wie ausgeführt das Vollbild einer rechtsseitigen Hemiparese mit motorischer und sensorischer Aphasie. Als Ausdruck einer generalisierten Arteriosklerose waren die Fuspulse beidseits nur abgeschwächt tastbar. Über beiden Femoralarterien sowie über beiden Carotiden waren Stenosegeräusche auskultierbar. Es fand sich eine ausgeprägte Varikosis beidseits sowie ein Narbenbruch im Bereich einer alten Cholecystektomienarbe. Im Übrigen war der klinische Befund unauffällig.

Blutbefund 21.5.1973: Hb 14,3; Erythrozyten 4,67 Millionen; FI 30,7 ; Leukozyten 7000; Basophile 3; Eosinophile 1; Stabkernige 2; Segmentkernige 59; Lymphozyten 32; Monozyten 4; Thrombozyten 154 000; Retikulozyten 27 ‰.

Elektrophorese: Albumine 58,9 rel.%; Alpha-1-Globuline 2,3 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,3 rel.%; Beta-Globuline 13,0 rel.%; Gamma-Globuline 18,0 rel.%; Gesamteiweiß 6,8 g%.

Therapie: die Patientin wurde im Versuchszeitraum medikamentös mit 2 x 1 Tabl. Lanicor tägl., 2 x 1 Drag. Briserin tägl. sowie 2 x 1 Drag. Dusodril tägl. behandelt. Alle Medikamente haben nach bisherigen pharmakologischen Erkenntnissen keinen Einfluß auf das lymphoretikuläre System.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin.
 Dauer der Infusion 3 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG.
 Gesamtisotopenmenge bei 65 kg: 6,5 mC/Tag x 3 = 19,5 mC.
 Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven
 Materials vom 12. - 15.6.1973.

Kulturen: S 56 18.6.1973 - 22.6.1973; S 57 3.7.1973 -
 7.7.1973; S 59 24.7.1973 - 27.7.1973.

Epikrise: die bei der Patientin bestehende neurologische
 Symptomatik bildete sich auch unter intensiver Therapie
 nicht zurück. Sie wurde am 26.7.1973 zur weiteren Pflege
 in ein Altersheim entlassen.

2.512 Patientin He.A.:

Diagnose: Glioblastom.

Anamnese: die 52jährige Patientin kam am 24.8.1971 mit
 einer Schwäche in der Muskulatur des rechten Armes so-
 wie des rechten Beines zur stationären Aufnahme. Die
 Ausfallserscheinungen hatten sich allmählich im Laufe
 einer Woche entwickelt. Es kam schließlich zur Ausbil-
 dung einer vollständigen spastischen Parese des rechten
 Armes und Beines, zur Entwicklung einer motorischen und
 sensorischen Aphasie sowie einer Inkontinenz.

Am 22.9.1971 wurde die Patientin in die neurochirurgische
 Abteilung des Klinikums Rechts der Isar der TU München
 verlegt, wo am 1.10.1971 eine operative Teilentfernung
 eines temporomedial gelegenen, bis zum Hirnstamm reichen-
 den Glioblastoms durchgeführt wurde. Postoperativ kam
 die Patientin am 15.10.1971 erneut in unsere Behandlung.

Klinischer Befund: auch postoperativ war das anamnestisch beschriebene neurologische Zustandsbild weitgehend unverändert. Im Übrigen fand sich ein unauffälliger klinischer Befund.

Blutbefund: BSG 45/81; Hb 14,0; Erythrozyten 4,35 Millionen; Leukozyten 7100; Basophile 2; Eosinophile 2; Stabkernige 1; Segmentkernige 57; Lymphozyten 33; Monozyten 3; Thrombozyten 169 000.

Elektrophorese: Albumine 53 rel.%; Alpha-1-Globuline 5 rel.%; Alpha-2-Globuline 12 rel.%; Beta-Globuline 13 rel.%; Gamma-Globuline 17 rel.%; Gesamteiweiß 7,0 g%.

Therapie: Die Patientin wurde im Versuchsstadium mit 2 x 2 Drag. Dusodril retard tägl., 2 x 1 Tabl. Lanicor tägl. sowie mit Optalidon und Psyquil nach Bedarf behandelt. Alle Medikamente haben nach bisherigen pharmakologischen Erkenntnissen keinen Einfluß auf das lymphoretikuläre System.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Infusion 7 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 56 kg: 5,6 mC/Tag x 7 = 39,2 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 7. - 14.12.1971.

Kulturen: S 33 14.12.1971 - 17.12.1971.

Epikrise: die Patientin wurde am 16.1.1972 bei Zustand nach operativer Teilresektion eines Glioblastoms leicht gebessert entlassen.

2.52 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie:

2.521 Patient Hög.J.:

Diagnose: chronische lymphatische Leukämie möglicherweise (siehe Immunelektrophorese) in Kombination mit einem Morbus Waldenström.

Anamnese: die CLL des 71jährigen Patienten war seit 1965 bekannt. Der Patient wurde von 1965 bis 1972 im wesentlichen mit Leukeran therapiert. Obwohl er Nichtraucher war, traten seit Ende 1971 wiederholt Bronchitiden auf. Außerdem klagte er über Belastungsdyspnoe und Ohrensausen. Er kam am 12.5.1972 erneut zur stationären Aufnahme.

Klinischer Befund: das Mediastinum war leicht verbreitert. Palpatorisch fanden sich multiple bohnen- bis walnußgroße Lymphknoten submandibulär, cervical, axillär und inguinal. Die Leber war 3 cm unter dem Rippenbogen, der Milzpol knapp über dem Beckenkamm tastbar.

Blutbefund 16.5.1972: BFS 40/123; Hb 8,87; Erythrozyten 2,27 Millionen; Leukozyten 37 000; Eosinophile 1; Segmentkernige 1; Lymphozyten 98; Thrombozyten 18 000; Retikulozyten 46 ‰; direkter und indirekter Coombstest schwach positiv.

Blutbefund 18.5.1972: Hb 8,5; Erythrozyten 2,33 Millionen; FI 36,5; Leukozyten 29 900; Segmentkernige 2; Lymphozyten 98.

Blutbefund 22.5.1972: Hb 9,45; Erythrozyten 2,50 Millionen; FI 37,8; Leukozyten 26 500. Es bestand eine hyperchrome Anämie.

Elektrophorese 25.5.1972: Albumine 63,2 rel.%; Alpha-1-Globuline 6,6 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,9 rel.%; Beta-Globuline 12,7 rel.%; Gamma-Globuline 8,7 rel.%; Gesamteiweiß 6,0 g%.

Elektrophorese 6.6.1972: Albumine 67,1 rel.%; Alpha-1-Globuline 6,0 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,9 rel.%; Beta-Globuline 11,3 rel.%; Gamma-Globuline 7,7 rel.%; Gesamteiweiß 5,9 g%.

Elektrophorese 30.6.1972: Albumine 70,0 rel.%; Alpha-1-Globuline 4,8 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,3 rel.%; Beta-Globuline 11,4 rel.%; Gamma-Globuline 6,7 rel.%; Gesamteiweiß 5,8 g%.

Immunelektrophorese: IgG 2,2 mg%; IgA 2,7 mg%; IgM 404 mg%. Die Immunelektrophorese zeigte also eine IgM-Paraproteinämie. Die Präzipitationslinien von IgG und IgA waren abgeschwächt.

Lymphknotenbefund: es fanden sich reife kleine Lymphozyten, daneben unreife Lymphozyten und lymphatische Retikulumzellen.

Knochenmarkbefund (Sternalpunktat): reifzellige lymphatische Infiltration, wie sie für die CLL charakteristisch ist. Daneben hyperplastische Erythropoese wohl auf die gesteigerte Hämolyse zurückzuführen, die der Patient zeigte. Wie ausgeführt, waren der direkte und der indirekte Coombstest schwach positiv.

Therapie: während des Ansatzzeitraums erfolgte keine krankheitsspezifische Therapie. Der Patient wurde in dieser Zeit medikamentös mit 2 x 1 Tabl. Lanicor tägl., 1 x 1 Tabl. Rastinon tägl. bei Altersdiabetes, Condorango-Wein zur Appetitanregung und Adumbran bei Einschlaf-

störungen. Alle diese Medikamente haben nach bisherigen pharmakologischen Erkenntnissen keinen Einfluß auf das lymphoretikuläre System. Nach Abschluß der wissenschaftlichen Untersuchungsreihe wurde zwischen dem 6.6. und dem 7.7.1972 eine Milzbestrahlung (24 Sitzungen = 560 RMD) durchgeführt.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin.

Dauer der Infusion 7 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 76,6 kg: 7,66 mC/Tag x 7 = 53,6 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 16. - 22.5.1972. Lymphknotenexstirpation linke Axilla 16.5.1972.

Kulturen: S 41 19.5.1972 - 24.5.1972; S 42 23.5.1972 - 29.5.1972; S 43 30.5.1972 - 6.6.1972; S 44 5.6.1972 - 10.6.1972.

Epikrise: unter der Therapie verkleinerte sich die Milz deutlich. Die Leukozytenzahlen sanken bis auf 12 900. Der Patient wurde erheblich gebessert am 20.7.1972 nach Hause entlassen. Er verstarb Ende des Jahres 1973. Seit Diagnosestellung 1965 waren also 8,5 Jahre verstrichen.

2.522 Patient Hu.J.:

Diagnose: chronische lymphatische Leukämie mit starker Proliferationstendenz. Wegen der Zytoplasmabasophilie und vereinzelt abgelagerten PAS-positiven Substanzen war die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß der Tumor Immunglobuline bildete, ohne sie ins Blut abzugeben.

Anamnese: im Jahr 1968 wurde erstmals eine aleukämische Leukämie diagnostiziert. Zunächst wurde der Patient mit Endoxen und Prednisolon behandelt. Im Februar 1971 wurden die cervicalen Lymphknoten beisseits mit insgesamt 18 000 rd bestrahlt. Im Mai 1971 kam der Patient erstmals in unsere Behandlung. Es fanden sich mehr als faustgroße Lymphknotenkonglomerate beisseits axillär, kleinere auch in der Leistengegend. Milz und Leber waren leicht vergrößert. Es erfolgte keine spezifische Therapie. Im November 1971 wurde der 61jährige Patient erneut stationär aufgenommen.

Klinischer Befund: Das Mediastinum war verbreitert. Die abdominalen Lymphknoten zeigten sich befallen. Der Lymphknotenstatus axillär und inguinal war unverändert.

Blutbefund 10.11.1971: BKS 2/6; Hb 13,7; Erythrozyten 4,46 Millionen; Leukozyten 6 100; Eosinophile 2; Stabkernige 1; Segmentkernige 49; Lymphozyten 48; Thrombozyten 46 000.

Lymphozytendifferenzierung 4.11.1971: Follikellymphozyten 87 %; PAS-positiv 48 %; 59 score.

Elektrophorese 10.11.1971: Albumine 70,0 rel.%; Alpha-1-Globuline 4,8 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,3 rel.%; Beta-Globuline 11,4 rel.%; Gamma-Globuline 6,7 rel.%; Gesamteiweiß 6,0 g%.

Lymphknotenbefund: zahlreiche, zum Teil plasmabasophile und PAS-positive kleine Lymphozyten.

Knochenmarkbefund: reifzellige lymphatische Infiltration.

Therapie: seit der Entlassung im Mai 1971 wurden täglich 10 mg Ultralan sowie eine Tablette Novothyral appliziert. Ultralan wurde ab dem 9.11.1971 nicht mehr verabreicht. Im Versuchszeitraum erfolgte keine krankheitsspezifische Therapie.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Infusion 10 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 75 kg: 7,50 mC/Tag x 10 = 75 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 10. - 19.11.1971. Lymphknotenexstirpation am 22.11.1971.

Kulturen: S 28 17.11.1971 - 21.11.1971; S 30 20.11.1971 - 28.11.1971.

Epikrise: bei Wiedervorstellung Mitte Juni 1972 war der Patient in gutem Allgemeinzustand. Die axillären Lymphknotenpakete zeigten nur noch Hühnereigröße. Die Leukozytenzahl hatte sich unter Velbe und Endoxan auf 3 000 bis 5 000 pro mm^3 verringert.

2.523 Patientin K.C.:

Diagnose: chronische lymphatische Leukämie mit geringer IgM-Bildung und einem relativ unreifen zytologischen Bild.

Anamnese: die 73jährige Patientin wurde im Oktober 1972 bei uns stationär aufgenommen. Obwohl sie schon seit einigen Monaten an starker Müdigkeit litt und 4 kg Gewicht verloren hatte, hatte sie noch bis vor 4 Wochen gearbeitet. Sie war zunächst wegen des Verdachtes auf

Anämie in das Kreis Krankenhaus Erding eingewiesen worden, wo keine krankheitsspezifische Therapie durchgeführt und schließlich die Überweisung in unsere Behandlung veranlaßt wurde.

Klinischer Befund: multiple ertsen- bis hahnengroße Lymphknoten beiseits cervical. Links axillar ein großes Lymphknotenkonglomerat. Die rechte Axilla war weitgehend frei. Kleine Lymphknotenvergrößerungen beiseits inguinal. Die Milz reichte bis zur Symphyse, die Leber stand bis 13 cm unter dem Rippenbogen. Humoral lag eine textliche Anämie mit einer Leukozytose von 500 000 bis 1,2 Millionen vor. Bei den weißen Zellen handelte es sich vorwiegend um Lymphozyten.

Blutbefund 8.11.1972: Hb 7,77; Erythrozyten 7,11 Millionen; Leukozyten 801 000; Segmentkernige 2; Lymphozyten 98; Thrombozyten 35 000; Retikulozyten 6 ‰.

Blutbefund 11.11.1972: Hb 7,93; Erythrozyten 5,48 Millionen; Leukozyten 813 000.

Blutbefund 13.11.1972: Hb 8,87; Erythrozyten 7,58 Millionen; Leukozyten 856 000; bei der Blutbilddifferenzierung fand sich auf 400 Lymphozyten nur 1 segmentkerniger Granulozyt; Thrombozyten 18 000; Retikulozyten 9 ‰.

Blutbefund 16.11.1972: Hb 8,12; Erythrozyten 7,50 Millionen; Leukozyten 914 000; Thrombozyten 20 000; Retikulozyten 12 ‰.

Blutbefund 20.11.1972: BKS 13/35; Hb 9,06; Erythrozyten 7,69 Millionen; Leukozyten 813 000; Thrombozyten 23 000; Retikulozyten 5 ‰.

Elektrophorese 9.11.1972: Albumine 63,4 rel.%; Alpha-1-Globuline 4,2 rel.%; Alpha-2-Globuline 10,9 rel.%; Beta-Globuline 9,5 rel.%; Gamma-Globuline 12,1 rel.%; Gesamteiweiß 5,8 g%.

Lymphknotenbefund: CLL-typische Lymphknotenhistologie.

Knochenmarkbefund (Sternalmark): massive lymphatische Infiltration unter Verdrängung der Hämatopoese.

Therapie: Im Ansatzzeitraum erhielt die Patientin pro Tag 2 x eine Tabl. Lanitop sowie bei Bedarf Valium 10. Nach bisherigen pharmakologischen Erkenntnissen beeinflussen diese Medikamente das lymphoretikuläre System nicht. Vom 11.12.1972 bis zum 25.1.1973 wurde eine Milzbestrahlung mit insgesamt 450 RMD durchgeführt. Im übrigen erhielt die Patientin Leukeran, Endoxan, Velbe, Ultralan, Vibramycin und Zyloric. Eine Verkleinerung der Milz konnte nicht erreicht werden. Die peripheren Lymphozytenzahlen schwankten zwischen 1 Million und 800 000 und stabilisierten sich im Finalstadium auf der letzten Zahl.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 9 Tage: davon 6 Tage Infusion und 3 Tage subkutane Applikation. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 58,3 kg: 5,80 mC/Tag x 9 = 52,2 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 21. - 27.11.1972. Subkutane Applikation des radioaktiven Materials vom 28. - 30.11.1972.

Kulturen: S 53 5.12.1972 - 10.12.1972.

Epikrise: der Allgemeinzustand der Patientin verschlechterte sich zusehends. Es stellte sich eine zunehmende Kachexie ein. Im Rahmen rezidivierender Bronchitiden kam die Patientin im Verlauf einer Pneumonie am 25.2.1973 durch akutes Herz-Kreislaufversagen ad exitum.

Seit Diagnosestellung am 2.11.1972 waren vier Monate verstrichen. Nach postmortaler Leber- und Milzpunktion ergab sich folgender Befund: massive Infiltration der Portalfelder der Leber mit Lymphozyten. In den Sinusoiden kleine lymphozytäre Nester und streifige Infiltrationen. Hochgradige lymphozytäre Infiltration der Milz. Die normale anatomische Struktur dieses Organs war völlig aufgehoben.

2.524 Patient R.A.:

Diagnose: typische chronische lymphatische Leukämie.

Anamnese: seit Oktober 1969 bestand eine zunehmende Leistungsminderung, Inappetenz und Gewichtsabnahme. Außerdem traten zunehmende Lymphknotenschwellungen beidseits inguinal auf. Im Januar 1970 wurde in unserer Klinik das Vorliegen einer CLL diagnostiziert. Es wurde eine isolierte Milzbestrahlung durchgeführt. Letzter stationärer Aufenthalt vor der Vivomarkierung 17.1. - 1.3.1972. Milzbestrahlung vom 26.1. - 1.3.1972 in 20 Sitzungen à 20 - 30 RMD = 550 RMD. Am 14.3.1972 war die Milz 3 Querfinger unter dem linken Rippenbogen zu tasten. Lymphknotenschwellungen bestanden nicht. Der 79jährige Patient kam am 14.4.1972 erneut in unsere Behandlung.

Klinischer Befund: Verdichtungen im linken Mediastinum. Die Milz war 3 Querfinger unter dem linken Rippenbogen zu tasten. Lymphknotenschwellungen bestanden nicht. Der Patient litt an einer Pneumonie.

Blutbefund 11.4.1972: Hb 12,6; Erythrozyten 4,09 Millionen; FI 30,8; Leukozyten 15 800; Thrombozyten 90 000; Retikulozyten 8 ‰.

Blutbefund 17.4.1972: Hb 10,5; Erythrozyten 3,66 Millionen; FI 27,7; Leukozyten 25 600; Basophile 1; Eosinophile 2; Segmentkernige 13; Lymphozyten 84; Thrombozyten 83 000.

Elektrophorese 11.4.1972: Albumine 62,3 rel.%; Alpha-1-Globuline 3,8 rel.%; Alpha-2-Globuline 8,5 rel.%; Beta-Globuline 9,4 rel.%; Gamma-Globuline 16,0 rel.%; Gesamteiweiß 6,6 g%.

Lymphknotenbefund: großer Zellreichtum. Fast ausschließlich kleine reife Lymphozyten. Wenig Lymphoblasten. Lymphatische Retikulumzellen waren nur vereinzelt nachweisbar.

Knochenmarkbefund (Sternalmark): Knochenmark von normaler Zelldichte. Vorwiegend kleine reife Lymphozyten. Daneben auch unreife Formen. Erythropoese in der Verteilung normal. Normoblastenreiche Bezirke. Granulopoese in der Verteilung ebenfalls normal. Allerdings erhebliche Kern-Plasma-Reifungsstörungen und Vermehrung der Eosinophilen. Verminderung der Megakaryozyten.

Therapie: während des Ansatzzeitraums wurde der Patient mit 3 x 0,1 mg Novodigal sowie 2 x 1 Tabl. Bisolvon tägl. behandelt. Eine Beeinflussung des lymphoretikulären Systems durch diese Medikamente ist nicht bekannt. Ab dem 20.4.1972 erhielt der Patient zusätzlich Foligan, Vibramycin und Novalgin.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 1 Tag: Beginn mit flash-injection mit 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 61 kg =

= 6,1 mC. Unmittelbar danach Fortsetzung der Markierung mit einer Infusion bis 24 h nach der flash-injection mit 0,15 Mikrocurie/g KG/24 h. Gesamtisotopenmenge bei 61 kg = 9,15 mC. Gesamte im Rahmen der Markierung applizierte Isotopenmenge also: 6,1 mC + 9,15 mC = 15,25 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Applikation des radioaktiven Materials vom 13. - 14.4.1972.

Kulturen: S 36 13.4.1972 - 18.4.1972; S 38 17.4.1972 - 24.4.1972.

Epikrise: im Sommer des Jahres 1972 verschlechterte sich der Zustand des Patienten durch eine fieberhafte Exacerbation seiner chronischen Emphysebronchitis beträchtlich. Es trat eine cerebrovaskuläre Insuffizienz auf, außerdem prägte sich ein Diabetes mellitus deutlich aus. Hämatologisch konnte der Patient durch eine erneute Milzbestrahlung vollständig kompensiert werden. Er litt dann den ganzen Winter an bronchitischen Beschwerden, außerdem trat ein Herpes zoster im Bereich des Rückens und des linken Rippenbogens auf. Am 11.4.1973 befand sich der Patient hämatologisch in einem erfreulich guten Zustand. Die Milz war nicht vergrößert. Periphere Lymphknotenvergrößerungen lagen nicht vor. Seit diesem Zeitpunkt sind weitere Befunde nicht bekannt. Die Überlebenszeit seit der Diagnosestellung betrug demnach 3,5 Jahre.

Außerdem wurden bei diesem Patienten 2 Knochenmarkkulturen, die ebenfalls nach Vivomarkierung mit radioaktivem ^3H -Thymidin erstellt worden waren, in die Untersuchung mit einbezogen. Es handelt sich um die Kulturen S 4 3.12.1970 - 13.12.1970 und S 6 8.12.1970 - 11.12.1970. Dazu sei folgendes angemerkt:

Klinischer Befund: leicht reduzierter Allgemeinzustand, pectanginöse Beschwerden, Leistungsschwäche. Es bestand damals eine generalisierte Lymphknotenschwellung, insbesondere fanden sich inguinal größere Lymphknotenpakete. Die Milz war derb und zwei Querfinger unter dem linken Rippenbogen tastbar, die Leber war leicht vergrößert. Wie bereits erwähnt, bestand ein Altersemphysem.

Blutbefund 24.11.1970: Hb 10,5; Erythrozyten 3,20 Millionen; FI 32,4; Leukozyten 94 800; Segmentkernige 3; Lymphozyten 97; Thrombozyten 131 000; Retikulozyten 25 ‰.

Elektrophorese 13.11.1970: Albumine 61,1 rel.%; Alpha-1-Globuline 2,7 rel.%; Alpha-2-Globuline 10,6 rel.%; Beta-Globuline 8,8 rel.%; Gamma-Globuline 16,8 rel.%; Gesamteiweiß 6,9 g%.

Lymphknotenbefund: CLL-typische Veränderungen.

Knochenmarkbefund: Knochenmark mit starker lymphatischer Infiltration wie für eine chronische Lymphadenose typisch. Trotz der relativ guten peripheren Werte erschien die Hämatopoese stärker verdrängt.

Therapie: während des Ansatzzeitraumes wurden 3 x 0,1 mg Novodigal sowie 2 x 1 Tabl. Bisolvon tägl. appliziert. Eine krankheitsspezifische, das lymphoretikuläre System beeinflussende Therapie erfolgte nicht.

2.525 Patient S.W.:

Diagnose: typische chronische lymphatische Leukämie (die Lymphknoten wiesen einen relativ hohen IgM-Gehalt

auf, so daß eine ganz geringe IgM-Bildung oder eine Bestückung der Membran mit IgM anzunehmen war).

Anamnese: im Zusammenhang mit einer Appendektomie im Dezember 1971 wurde ein Lymphknoten extirpiert. Bei der Untersuchung dieses Lymphknotens wurde die Diagnose chronische Lymphadenose gestellt. Der Patient wurde daraufhin vier Wochen lang mit Prednisolon behandelt. Er befand sich bis zum Frühsommer 1972 in relativ gutem Allgemeinzustand. Wegen einer rapiden Verschlechterung des Befindens erfolgte dann am 15.6.1972 die stationäre Aufnahme des 66jährigen Patienten in unserem Hause.

Klinischer Befund: es fanden sich cervical und submandibulär bohnen große Lymphknoten. Beidseits axillär waren faustgroße lymphonoduläre Konglomerate tastbar. Beidseits inguinal waren fingerdicke lymphatische Stränge nachweisbar. Die Leber war 9 cm unter dem rechten, die Milz 12 cm unter dem linken Rippenbogen konsistenzvermehrt tastbar. Am Thorax fand sich eine geringe Verbreiterung der oberen Mediastinums. Es bestand eine pneumonische Infiltration im linken Mittelfeld mit kleinen Atelektasen und außerdem ein kirschgroßer, unscharf begrenzter Schatten im linken Oberfeld. Das Hilustomogramm zeigte am unteren rechten Hiluspol eine Verdichtung, die einem vergrößerten Lymphknoten entsprach.

Blutbefund 15.6.1972: Hb 5,1; Erythrozyten 1,55 Millionen; Leukozyten 41 400; Segmentkernige 8; Lymphozyten 90; Monozyten 2; Thrombozyten 47 000; Retikulozyten 1 ‰;

Blutbefund 19.6.1972: BKS 40/86; Hb 5,66; Erythrozyten 2,08 Millionen; Leukozyten 42 400; Segmentkernige 5; Lymphozyten 93; Monozyten 2; Thrombozyten 46 000; Retikulozyten 2 ‰.

Blutbefund 20.6.1972: Hb 7,55; Erythrozyten 2,51 Millionen; Leukozyten 32 600; Thrombozyten 50 000; Retikulozyten 1 %.

Blutbefund 18.7.1972: Leukozyten 5 400; Segmentkernige 7; Lymphozyten 91; Monozyten 2.

Elektrophorese 16.6.1972: Albumine 70,5 rel.%; Alpha-1-Globuline 3,9 rel.%; Alpha-2-Globuline 8,3 rel.%; Beta-Globuline 9,0 rel.%; Gamma-Globuline 8,4 rel.%; Gesamteiweiß 6,7 g%.

Lymphknotenbefund: CLL-typische Veränderungen.

Knochenmarkbefund: es fanden sich nahezu ausschließlich reife kleine Lymphozyten. Die Erythro- und Granulopoese waren weit in den Hintergrund gedrängt.

Therapie: der Patient erhielt pro Tag 3 x 1 Tabl. Lanitop, 3 x 1 Tabl. Sinquan 25 sowie 2 x 1 Tabl. Bactrim. Eine krankheitsspezifische, das lymphoretikuläre System beeinflussende Therapie erfolgte während des Ansatzzeitraumes nicht.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung I mit ^3H -Thymidin. Dauer der Infusion 8 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 71,5 kg: 7,15 mC/Tag x 8 = 57,2 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 21. - 30.6.1972.

Kulturen: S 47 29.6.1972 - 6.7.1972; S 48 14.7.1972 - 20.7.1972.

Zwischenanamnese: zwischen dem 21.8. und dem 1.9.1972 wurde eine Milzbestrahlung mit 10 Sitzungen à 10 RMD = 100 RMD durchgeführt. Die Bestrahlung mußte wegen des Auftretens einer Leukopenie vorzeitig abgebrochen werden. Medikamentös wurde der Patient mit Proviron, Cortrophin S und Ultralan therapiert.

Klinischer Befund (November 1972): der Milzpol war 11 cm unterhalb des linken, der untere Leberrand 6 cm unterhalb des rechten Rippenbogens tastbar. Links axillär fand sich ein kirschgroßer Lymphknoten, beidseits cervical waren erbs- bis bohnen große Lymphknoten nachweisbar.

Blutbefund 12.11.1972: Hb 9,45; Erythrozyten 2,3 Millionen; Leukozyten 3 000; Segmentkernige 27; Lymphozyten 73; Thrombozyten 24 000; Retikulozyten 4 ‰.

Blutbefund 16.11.1972: BKS 30/13; Hb 7,36; Erythrozyten 2,45 Millionen; Leukozyten 2 200; Thrombozyten 19 000.

Elektrophorese 9.11.1972: Albumine 67,3 rel.%; Alpha-1-Globuline 4,8 rel.%; Alpha-2-Globuline 7,7 rel.%; Beta-Globuline 9,8 rel.%; Gamma-Globuline 10,8 rel.%; Gesamteiweiß 4,8 g%.

Elektrophorese 13.11.1972: Albumine 69,6 rel.%; Alpha-1-Globuline 4,3 rel.%; Alpha-2-Globuline 6,2 rel.%; Beta-Globuline 10,0 rel.%; Gamma-Globuline 9,4 rel.%; Gesamteiweiß 5,0 g%.

Lymphknotenbefund: stark zerstörte Struktur. Zahlreiche kleine Lymphozyten. Dazwischen größere Proliferationsnester mit Prolymphozyten, Lymphoblasten und hoher mitotischer Aktivität.

Therapie: während des Ansatzzeitraums erfolgte keine krankheitsspezifische Therapie. Der Patient erhielt täglich 3 x 1 Tabl. Lanitop, 3 x 1 Tabl. Sinquan 25 sowie Phosphalugel bei Bedarf.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung II mit ^3H -Thymidin. Dauer der Infusion 2 Tage. Tagesdosis 0,1 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 73 kg: 7,3 mC/Tag x 2 = 14,6 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 16. - 18.11.1972.

Kulturen: S 51 21.11.1972 - 25.11.1972.

Epikrise: ab Herbst 1972 stand ein aplastisches Syndrom bei zunehmender Splenomegalie im Vordergrund des Krankheitsbildes. Eine Behandlung mit Transfusionen blieb ineffektiv, da die Erythrozyten und Thrombozyten in der Milz sofort sequestriert wurden. Die angestrebte Milzexstirpation mußte wegen zunehmender Verschlechterung des Allgemeinzustandes - rezidivierende Pneumonien, generelle Blutungsneigung als Folge des aplastischen Syndroms - immer wieder verschoben werden. Am 16.1.1973 kam der Patient an den beschriebenen Komplikationen ad exitum. Die Überlebenszeit seit der Diagnosestellung im Dezember 1971 betrug 13 Monate.

2.53 Patienten mit Lymphogranulomatose

2.531 Patientin A.R.:

Diagnose: Lymphogranulomatose Stadium IV

Anamnese: im Sommer 1970 trat bei der Patientin an der linken Halsseite erstmals ein Lymphom auf. Am 3.12.1970

wurde nach Lymphknotenexstirpation und histologischer Untersuchung des gewonnenen Materials die Diagnose Lymphogranulomatose gestellt. Im Anschluß daran kam die Patientin erstmals in unsere Behandlung. An der linken Halsseite fand sich ein größeres Lymphknoten-konglomerat. Leber und Milz waren nicht vergrößert. Die Patientin wurde mit einem Gammatron bestrahlt. Im September 1971 wurde die Patientin in mäßigem Allgemeinzustand erneut bei uns aufgenommen.

Klinischer Befund: es fanden sich große Lymphknotenpakete im Bereich des rechten Halsdreiecks sowie nuchal. In der linken Achselhöhle war ein kirschgroßer Lymphknoten tastbar. Leber und Milz waren nicht vergrößert. Das Skelettsystem war im Sinne der Grundkrankheit befallen.

Blutbefund 21.9.1971: BKS 75/110; Hb 12,4; Erythrozyten 4.55 Millionen; Leukozyten 18 300; Segmentkernige 92; Lymphozyten 7; Monozyten 1; Thrombozyten 93 000; Retikulozyten 25 %.

Elektrophorese 21.9.1971: Albumine 46,8 rel.%; Alpha-1-Globuline 7,2 rel.%; Alpha-2-Globuline 15,1 rel.%; Beta-Globuline 12,2 rel.%; Gamma-Globuline 18,7 rel.%; Gesamteiweiß 5,7 g%.

Lymphknotenbefund: neben Zellen der lymphatischen Reihe, wobei die reifen kleinen überwogen, fanden sich eosinophile und neutrophile Granulozyten mäßig vermehrt. Hodgkinzellen und Sternbergsche Riesenzellen waren nachweisbar. Es fanden sich keine reifen Plasmazellen, jedoch deren Vorstufen. Außerdem wurden undifferenzierte Retikulumzellen und Vorstufen basophiler Granulozyten beobachtet.

Knochenmarkbefund: das Knochenmark wies keine pathologischen Veränderungen auf.

Therapie: während des Ansatzzeitraumes erhielt die Patientin pro Tag 3 x 0,1 mg Novodigal sowie 1 Tabl. Mogadan bei Bedarf am Abend zum Einschlafen. Eine krankheitsspezifische Therapie erfolgte nicht.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 1 Tag. Tagesdosis 0,15 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 50 kg = 7,5 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Applikation des radioaktiven Materials am 24.9.1971 mittels flash-injection.

Kulturen: S 24 24.9.1971 - 1.10.1971.

Epikrise: in der Folgezeit wurde die Patientin erneut mit dem Gammatron bestrahlt. Im Rahmen der zytostatischen Therapie kamen die Präparate Velbe und Endoxan zum Einsatz. Daneben wurde Delta-Butazolidin verabreicht. Die Patientin kam schließlich wesentlich gebessert zur Entlassung. Zum Zeitpunkt der letzten Befunderhebung nach einem erneuten Klinikaufenthalt im Winter 1972 war sie im April 1972 stark kachektisch. Die humoralen Befunde sprachen für eine starke Aktivität des Krankheitsprozesses. Die Überlebenszeit seit der Diagnosestellung im Dezember 1970 betrug 17 Monate.

2.532 Patient Hö.A.:

Diagnose: Lymphogranulomatose Stadium III - IV

Anamnese: seit Mitte 1970 bestand eine indolente derbe erbsgroße Lymphknotenschwellung an der linken Halsseite.

Im Mai 1971 wurde eine Lymphogranulomatose vom nodulär-sklerosierenden Typ diagnostiziert. Der Patient klagte über Atemnot bei Anstrengungen, häufiges Schwitzen sowie ein Engegefühl am Hals.

Klinischer Befund: an der linken Halsseite fanden sich 6 - 8 derbe, nicht druckschmerzhaft Lymphknoten von 2 - 3 cm Durchmesser. An der rechten Halsseite war ein taubeneigroßer Lymphknoten nachweisbar. In der linken Axilla wurden 1 kirschengroße, in der rechten Axilla 1 erbsengroßer Lymphknoten getastet. Milz und Leber waren nicht tastbar vergrößert. Szintigraphisch war die Milz plump verbreitert und zeigte ein homogenes Speicherungsmuster. Lymphographisch fanden sich vereinselte pathologisch veränderte Lymphknoten in Höhe des 1. und 2. Lendenwirbelkörpers. Das obere Mediastinum wies eine geringgradige Verbreiterung auf. Die Hilusdrüsen rechts waren im Sinne der Grundkrankheit befallen.

Blutbefund 28.7.1971: BKS 44/76; Hb 14,1; Erythrozyten 5,13 Millionen; Leukozyten 17 100; Segmentkernige 80; Eosinophile 2; Lymphozyten 18; Thrombozyten 92 000; Retikulozyten 9 ‰.

Elektrophorese 30.7.1971: Albumine 63,1 rel.%; Alpha-1-Globuline 3,3 rel.%; Alpha-2-Globuline 9,0 rel.%; Beta-Globuline 8,2 rel.%; Gamma-Globuline 16,4 rel.%; Gesamteiweiß 7,1 g%.

Lymphknotenbefund: neben kleinen Lymphozyten fanden sich große retikuläre Zellen, Hodgkinzellen und Sternbergsche Riesenzellen. Die eosinophilen Granulozyten waren vermehrt. Außerdem war eine geringe Vermehrung der Plasmazellen und undifferenzierter Retikulumzellen nachweisbar.

Knochenmarkbefund: es fanden sich deutliche reaktive Veränderungen. Im Rahmen der Erythropoese waren Farbstoffmangelzeichen feststellbar. Neben einer deutlichen Vermehrung eosinophiler Granulozyten fand sich eine auffallend große Zahl lymphatischer Retikulumzellen. Die Granulopoese war quantitativ und qualitativ gestört.

Therapie: der Patient wurde im Ansatzzeitraum mit Phosphalugel und wegen Übelkeit bei Bedarf mit Vomex A und Paspertin behandelt. Eine krankheitsspezifische Therapie erfolgte nicht.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 1 Tag. Tagesdosis 0,15 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 80 kg = 12 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Applikation des radioaktiven Materials am 9.8.1971 mittels flash-injection.

Kulturen: Aw 10.8.1971 - 17.8.1971; Aw₂ 17.8.1971 - 26.8.1971.

Epikrise: der Patient wurde am 9.11.1971 nach Strahlenbehandlung der Milz, der abdominellen Lymphknoten und des Mediastinums gebessert entlassen. Die Überlebenszeit seit der Diagnosestellung im Mai 1971 betrug 6 Monate.

2.533 Patient M.F.:

Diagnose: Lymphogranulomatose Stadium IV mit Vorherrschen der lymphozytären Komponente.

Anamnese: das Vorliegen einer Lymphogranulomatose war seit Mitte 1970 bekannt. Der Patient kam am 22.11.1971

wegen eines abdominell und retroperitoneal proliferierten Morbus Hodgkin und einer chronischen Erythrocytose ist unsere Behandlung. Es bestanden von der Lendenwirbelsäule gürtelförmig nach vorne ziehende stechende Schmerzen.

Klinischer Befund: es fanden sich kleine inguinale Lymphome und eine Hepatosplenomegalie. Das Skelettsystem war im Sinne der Grundkrankheit befallen. Es bestand ein weitgehender Befall der abdominellen Lymphknoten. Der Patient litt an einer Proteinurie.

Blutbefund 15.12.1971: HKS 112/160; Hb 9,6%; Erythrozyten 4,34 Millionen; Leukozyten 5 600.

Blutbefund 17.12.1971: Hb 10,2; Erythrozyten 5,83 Millionen; Leukozyten 5 100; Segmentkernige 74; Eosinophile 7; Lymphozyten 14; Monozyten 5; Thrombozyten 195 000; Retikulozyten 27 %.

Elektrophorese 23.12.1971: Albumine 41,4 rel.%; Alpha-1-Globuline 5,5 rel.%; Alpha-2-Globuline 15,6 rel.%; Beta-Globuline 15,6 rel.%; Gamma-Globuline 21,9 rel.%; Gesamteiweiß 6,3 g%.

Therapie: Bestrahlung der Lendenwirbelsäule und anschließend der retroperitonealen und abdominellen Lymphknoten während des Ansatzzeitraums.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung I mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 1 Tag. Tagesdosis 0,15 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 73,5 kg = 11 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Infusion des radioaktiven Materials vom 17. - 18.12.1971.

Kulturen: S 35 27.12.1971 - 2.1.1972.

Zwischenanamnese: unter der obengenannten Therapie besserten sich die Schmerzzustände des Patienten und die Hepatosplenomegalie nahm ab. Der Patient fühlte sich subjektiv wohl und nahm seinen Beruf wieder auf. Er wurde am 5.4.1972 zu einer Kontrolluntersuchung erneut in unsere Behandlung überwiesen.

Klinischer Befund: es waren keine Lymphome nachweisbar. Der Milztumor hatte seit der letzten Untersuchung etwas zugenommen und das Organ war in der Inspiration 3 cm unter dem linken Rippenbogen tastbar. Das linke Mediastinum war etwas verbreitert.

Blutbefund 5.4.1972: BKS 95/137; Hb 10,7; Erythrozyten 3,92 Millionen; Leukozyten 4 600; Thrombozyten 185 000; Retikulozyten 10 %.

Blutbefund 6.4.1972: Hb 10,2; Erythrozyten 3,63 Millionen; Leukozyten 4 100; Segmentkernige 69; Eosinophile 2; Stabkernige 3; Lymphozyten 24; Monozyten 2; Thrombozyten 110 000; Retikulozyten 25 %.

Therapie: im Ansatzzeitraum erfolgte keine Therapie.

Versuchsbedingungen: Vivomarkierung II mit ^3H -Thymidin. Dauer der Markierung 1 Tag. Tagesdosis 0,15 Mikrocurie/g KG. Gesamtisotopenmenge bei 75 kg = 11,25 mC. Spezifische Aktivität 5 C/mM. Applikation des radioaktiven Materials am 6.4.1972 mittels flash-injection.

Kulturen: S 37 7.4.1972 - 14.4.1972.

Epikrise: seit April 1972 wurde der Patient konsequent zytostatisch mit Velbe behandelt. Ab Herbst 1972 war eine deutliche Progredienz des Krankheitsprozesses zu beobachten. Im April 1973 wurde eine Splenektomie durchgeführt. Die Überlebenszeit seit der Diagnosestellung im Sommer 1970 betrug 3 Jahre.

3. Diskussion der Methode

Phytohämagglutinin (PHA) ist wie ausgeführt ein Wirkstoff aus der roten Nierenbohne *Phaseolus vulgaris*, dessen Zellbindung über ein Glykopeptid abläuft. Der Zusatz dieser Substanz zu Lymphozyten in vitro führt wie beschrieben zu morphologischen Reaktionen, die sonst bei Kontakt sensibilisierter Zellen mit ihrem spezifischen Antigen stattfinden. Zahlreiche Studien belegten seither, daß diese Entwicklung von Immunblasten aus kleinen Lymphozyten unter PHA als Maß ihrer Allergieleistung vom verzögerten Typ im klassischen Sinne gelten kann (59, 76). Große Lymphozyten sind so gut wie nicht an dieser Reaktion beteiligt (41).

Die Zuordnung der nach PHA auftretenden Blasten zur T-Zellreihe ist nach Rezeptoruntersuchungen und elektronenmikroskopischen Analysen gesichert (8, 22, 41, 193).

B-Lymphozyten reagieren nicht auf PHA in vitro, allenfalls kann anscheinend in Gegenwart einer genügend großen Zahl von T-Zellen ein geringer Prozentsatz von B-Zellen mit zur Transformation angeregt werden (72, 79).

Letztere Bedingung gilt sicher nicht für die CLL. Hier fand sich in allen Untersuchungen (95, 146, 147, 158, 182) mit weiter Streuung eine auf durchschnittlich ein Fünftel reduzierte relative Anzahl zu Blasten transformierender Lymphozyten. Das Verhältnis von Ausmaß der Lymphozytose im peripheren Blut zum Grade der Transformationserniedrigung war meist direkt proportional (12, 91, 190).

Morphologische, funktionelle und elektronenmikroskopische Analysen zeigten, daß sich PHA-Blasten bei der CLL nicht von denen gesunder Spender unterschieden (13, 57, 193, 232), also Abkömmlinge der normalen T-Zellreihe sind.

Bei der Lymphogranulomatose und bei Normalpatienten kann es zwar zu einer Mittransformation von B-Zellen kommen, das Ausmaß ist aber sicher derart gering, daß sie vernachlässigt werden kann.

Demzufolge sind sicher nahezu alle in unseren Untersuchungen gefundenen Blasten Abkömmlinge der T-Zellreihe. Dieses morphologisch in unseren kinetischen Ansätzen von anderen Zellreihen nicht zu unterscheidende Compartment wird demnach durch Transformation nach PHA-Zusatz gewissermaßen demaskiert.

4. Ergebnisse und Interpretation

4.1 Normalpatienten:

4.1.1 Zellbewegungen: (s. Graphiken S 33, S 56, S 57, S 59)

Die kleinen Lymphozyten zeigen in jedem Fall vom Kulturbeginn an einen konstanten Abfall ihres prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl, der bei S 33 und S 56 zwischen Tag 2 und 3, bei S 57 zwischen Tag 3 und 4 seine größte Steilheit erreicht.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten an der Gesamtzellzahl hält sich bei geringfügigen Schwankungen unter 10 % in allen Ansätzen im gesamten Kulturverlauf relativ konstant.

Analoges Verhalten zeigt die Fraktion der großen Lymphozyten, wobei die Schwankungen ihres prozentualen Anteils mit 5 % noch geringer sind als bei der mittleren Fraktion.

Spiegelbildlich zum Abfall der kleinen Lymphozyten steigt der prozentuale Anteil der Lymphoblasten zwischen dem 2. und dem 4. Kulturtag steil an. Bei S 33 kommt es zwischen Tag 2 und 3 zu einem Anstieg des relativen Blastenanteils von 8,87 % auf 24,11 %, bei S 56 von 9,38 % auf 37,36 %. Bei S 57 steigt der relative Blastenanteil erst zwischen Tag 3 und 4 steil von 9,0 % auf 29,09 %, während bei S 56 zwischen Tag 3 und 4 nur noch eine geringfügige Zunahme

der Lymphoblasten von 37,36 % auf 43,06 % zu beobachten ist. Im Ansatz S 59 beträgt der prozentuale Lymphoblastenanteil am Tag 3 36,23 %.

Relative Konstanz zeigt der prozentuale Anteil der Pyknosen an der Gesamtzellzahl, dessen Schwankungen nur geringfügig über 5 % liegen. Abweichend von dieser Regel findet sich bei S 33 ein stärkerer Anstieg des relativen Pyknosenanteils zwischen Tag 0 und 3 von 14,68 % auf 24,21 %.

4.12 Markierungsverhalten: (s. Graphiken und Tabellen I und II S 33, S 56, S 57, S 59) Bei den kleinen Lymphozyten findet sich in den Ansätzen S 33 und S 56 ein deutlicher Abfall des Markierungsindex und der markierten Zellen pro 1000 Kulturzellen vom 2. zum 3. bzw. 3. zum 4. Tag, während im Ansatz S 57 beide Parameter im gesamten Kulturverlauf relativ konstant bleiben. Die Markierungsintensität zeigt in allen Ansätzen weitgehende Konstanz im Kulturverlauf.

Der Markierungsindex und die Absolutzahl der markierten Kulturzellen weisen bei den mittleren Lymphozyten im Ansatz S 33 einen deutlichen Abfall zwischen Tag 2 und 3 aus. Im Ansatz S 56 ist dieser Abfall zwischen dem 2. und dem 4. Kulturtag noch stärker ausgeprägt, während bei S 57 beide Parameter im Kulturverlauf relativ konstant bleiben. Die Markierungsintensität dagegen fällt in allen Ansätzen zwischen Tag 0 und 4 deutlich ab.

Bei den großen Lymphozyten findet sich in allen Fällen ein steiler Abfall des Markierungsindex und der Absolutzahl der markierten Zellen im Kulturverlauf. Abweichend von dieser Regel erfolgt im Ansatz S 57 zwischen Tag 0

und 3 ein leichter Anstieg beider Parameter und erst zum Tag 4 der steile Abfall. Die Markierungsintensität zeigt in allen Ansätzen einen deutlichen Abfall im Kulturverlauf.

Bei den Lymphoblasten findet sich in allen Fällen ein steiler Abfall des Markierungsindex, der Absolutzahl der markierten Zellen und der Markierungsintensität im Kulturverlauf. Bezüglich der beiden letzteren Parameter ist dieser Abfall im Ansatz S 57 schwächer ausgeprägt.

Bei den Pyknosen erfolgt bei S 33 und S 57 ein deutlicher Anstieg des Markierungsindex zum Tag 4. Bei S 57 findet sich dann ein Abfall zum Tag 4. Bei S 56 haben wir einen konstanten Abfall des Pyknosenmarkierungsindex zwischen dem 2. und 4. Tag. Analoges Verhalten zeigen die markierten Zellen pro 1000 Kulturzellen. Der besonders deutlich ausgeprägte Anstieg markierter Pyknosen im Kulturverlauf bei S 33 korreliert mit einem deutlichen Abfall markierter kleiner, mittlerer und großer Lymphozyten. Die Markierungsintensität der Pyknosen zeigt in allen Ansätzen relative Konstanz im gesamten Kulturverlauf.

4.13 Agglutinations-Effekt: (s. Tabellen III S 33, S 56, S 57, S 59) Erkennbar am Prozentsatz der in Inseln liegenden Zellen - die Agglutinatbildung ist, wie der Vergleich mit Nullkulturen zeigt, ein PHA-Effekt - sprechen die Lymphozyten in allen Ansätzen im gesamten Kulturverlauf relativ gleichmäßig auf PHA an. Abweichend von der Norm ist der Prozentsatz der in Inseln liegenden Zellen bei S 33 am Tag 3 mit 74,42 % relativ niedrig.

Der Ansatz S 59 ist nur eingeschränkt verwertbar, da lediglich die Ergebnisse des 3. Tages vorliegen und

insoweit ein kinetisches Verhalten nicht zu erkennen ist. Die ermittelten Werte fügen sich allerdings gut in das allgemeine Verhalten von Normallymphozyten unter PHA am 3. Kulturtag ein.

4.14 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungs- verhaltens von Normallymphozyten unter PHA-Wirkung:

Die Zellverteilung in den Kulturen, also das Verhältnis der frei liegenden Zellen zu den in Agglutinatn befindlichen Zellen, wies im Verlauf der Kulturen nur geringfügige prozentuale Schwankungen auf. Die Bildung von Zellinseln ist ein PHA-Effekt, wie sich durch Vergleiche zwischen PHA-stimulierten Kulturen und nicht mit PHA stimulierten Nullkulturen, in denen sich keine Zellinseln nachweisen ließen, zeigte.

Bei allen Normalpatienten fanden sich schon bei den Nullerntn, also 2 Stunden nach PHA-Zusatz, hohe Agglutinatprozentsätze. Sie hielten sich bei unbedeutenden Schwankungen im Kulturverlauf konstant. Dies sprach für ein frühes und wie eingangs erwähnt regelrechtes Ansprechen der Normallymphozyten auf PHA.

Außerdem gestatteten es die geringen prozentualen Schwankungen des Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf, gestörte Vitalbedingungen der Normallymphozyten unter Wirkung des PHA weitgehend auszuschließen. Die größten Zellverluste traten nämlich - von natürlicher Zellinvolution zu späten Kulturterminen abgesehen (s. Graphiken der CLL- und Lymphogranulomatosepatienten) - im Rahmen der Blastopoese auf, und diese erfolgte vorzugsweise in den Agglutinatn. Gestörte Vitalbedingungen unter PHA hätten also letztlich zum Untergang ganzer Zellinseln und damit zum starken Abfall des Agglutinatprozentsatzes führen müssen.

Die Normallymphozyten sprachen also nach unseren Untersuchungen frühzeitig, gleichmäßig und ohne Störung ihrer Vitalität auf PHA an.

Der kontinuierliche Abfall des prozentualen Anteils kleiner Lymphozyten bei fast spiegelbildlichem Anstieg des relativen Blastenanteils im Kulturverlauf ließ einen direkten Zusammenhang dieser beiden morphologischen Zelltypen im Sinne eines Übergangs von kleinen Lymphozyten in Lymphoblasten annehmen. Die Verluste an kleinen Lymphozyten zwischen Tag 0 und 4 entsprachen quantitativ, wie die zugehörigen Graphiken (S 53, S 56, S 57) zeigen, fast genau dem Zugewinn der Lymphoblasten in diesem Zeitraum. Die stärkste Blastenvermehrung fand sich korrelierend mit der stärksten Verminderung der kleinen Fraktion bei S 53 und S 56 am Tag 3, bei S 57 am Tag 4 und wies damit diese beiden Termine als Hauptzeitraum der Blastopoese aus.

Die Tatsache, daß besonders zum Zeitpunkt der stärksten Transformation die prozentualen Gewinne der Blastenfraktion etwas größer waren als die Verluste der kleinen (s. Graphik S 56), ließ sich im Sinne eines "self-feeding" (113) der Blastenfraktion interpretieren, wonach Blasten aus Blasten hervorgehen.

Bei Normalpatienten proliferierten also unter Antigenwirkung vorzugsweise kleine Lymphozyten zu Blasten, am stärksten am 3. und 4. Kulturtag. Daneben gingen in geringem Ausmaß im Sinne eines "self-feeding" (113) Blasten aus Blasten hervor.

Die Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten wies in keiner Normalkultur eine wesentliche größere Amplitude als 10 % bzw. 5 % auf. Die Größenordnung dieser Bewegungen

sprach gegen eine deutlichere Beteiligung beider Zellfraktionen an der Blastopoese, wobei sich die große Fraktion noch träger verhielt als die mittlere.

Ein konstanter minimaler Anstieg der großen Lymphozyten zum Zeitpunkt des stärksten Abfalls der kleinen Fraktion sprach für einen quantitativ unbedeutenden Übergang kleiner Lymphozyten in große. Das gleiche war auch im Verhältnis der mittleren zu den kleinen Lymphozyten zu beobachten. Ebenso war wohl ein gewisser Abfall mittlerer Lymphozyten bei unbedeutendem konstantem Anstieg der großen als geringfügiger Übergang von Zellen aus der mittleren in die große Fraktion anzusehen.

Da eine Eigenbeteiligung der großen und mittleren Lymphozyten an der Blastopoese weitgehend ausgeschlossen war, waren diese Bewegungen wahrscheinlich durch das Auftreten eines geringen Prozentsatzes zu Blasten transformierender kleiner Lymphozyten als "transitional cells" (61, 175) in diesen beiden Fraktionen bedingt.

Mittlere und große Lymphozyten reagierten also bei Normalpatienten unter PHA-Wirkung außerordentlich träge und lieferten allenfalls einen geringen Beitrag zur Blastopoese. Ein unbedeutender Prozentsatz zu Blasten transformierender kleiner Lymphozyten trat in Form von "transitional cells" (61, 175) im morphologischen Erscheinungsbild der Zellen dieser beiden Fraktionen auf. Die überwiegende Mehrzahl der mittleren und großen Lymphozyten erwiesen sich also als in vitro nicht PHA-reaktive B-Lymphozyten.

Der relativ geringe Anstieg des prozentualen Anteils der Pyknosen im Kulturverlauf sprach ebenso wie die eingangs

erwähnte prozentuale Konstanz der Zellverteilung gegen gestörte Vitalbedingungen von Normallymphozyten unter PHA-Wirkung. Da Pyknosen zumindest etwa ab dem Tag 4 vorzugsweise aus der Blastopoese stammen - erst ab Tag 5 konnte (s. Graphiken CLL und Lymphogranulomatose) ein konstanter steiler Anstieg des relativen Pyknosenanteils beobachtet werden, bedingt wohl durch generalisierten Zelluntergang zu späten Terminen durch Veränderungen im Kulturmedium und damit Verschlechterung der Lebensbedingungen der Kulturzellen - ließ dieser geringe Anstieg des relativen Pyknosenanteils auch auf günstige Bedingungen bei der Transformation schließen.

Abweichend von dieser Regel fand sich bei S 33 ein stärkerer Anstieg des prozentualen Anteils der Pyknosen an der Gesamtzellzahl zwischen Tag 0 und 3 von 14,68 % auf 24,21 %. Zusätzlich zeigte sich bei Anstieg des Pyknosenmarkierungsindex eine ausgeprägte Zunahme markierter Pyknosen korrelierend mit einem deutlichen Abfall markierter kleiner, mittlerer und großer Lymphozyten sowie mit 74,42 % ein relativ niedriger Agglutinatprozentsatz.

Dieses Verhalten der Pyknosen in Korrelation mit dem Verhalten der anderen Zellfraktionen, dem niedrigen Agglutinatprozentsatz und einem für Normallymphozyten relativ geringen Erfolg der Blastopoese (24,11 % Immunoblasten am Tag 3) sprach für gestörte Vitalbedingungen der Lymphozyten in diesem Ansatz.

Diese Störung war sicher kulturtechnisch bedingt, wie auch die Betrachtung der nicht stimulierten Vergleichskultur S 33 OPHA zeigte, die ebenfalls einen ungewöhnlich hohen Pyknosenanteil von 20,13 % am Tag 3 aufwies.

An sich waren also alle Zellen der Kultur relativ gleichmäßig von der Störung betroffen. Daß sie sich trotzdem am stärksten in der Blastopoese auswirkte, deutlich am niedrigen Agglutinatprozentsatz und am geringen relativen Immunoblastenanteil, lag wohl an der größeren Störanfälligkeit transformierender aktiver Zellen, während die ruhenden Elemente weniger empfindlich waren. Die späteren Termine dieses Ansatzes waren wegen massivsten Detritus nicht mehr verwertbar.

Bezüglich Markierungsindex und Absolutzahl markierter Zellen zeigten die kleinen Lymphozyten in allen Ansätzen vom Kulturbeginn an zunächst einen mäßigen, dann einen deutlichen Abfall zum Zeitpunkt der stärksten Transformation. Der Markierungsindex und die Absolutzahl markierter Immunoblasten fielen ebenfalls deutlich zum 3. - 4. Tag ab. Bei der Absolutzahl war der Abfall weniger ausgeprägt.

Dieses Markierungsverhalten ließ erkennen, daß zu frühen Terminen vor allem stark markierte kleine Lymphozyten zur Transformation kamen. Zum Zeitpunkt der Haupttransformation dagegen (Tag 3 und 4) hatte der Anteil schwächer bzw. nicht markierter kleiner Lymphozyten an der Blastopoese großen Umfang angenommen.

Das in den Ansätzen S 33, S 56 und S 57 zu beobachtende Phänomen, das zu den frühen Terminen der Kultur der Markierungsindex der Blasten um das Vielfache über dem der übrigen Zellfraktionen lag, bedarf spezieller Diskussion.

Zunächst läge die Möglichkeit nahe, daß frei zirkulierendes Isotopenmaterial trotz der oben geschilderten methodischen Vorkehrungen von teilungsfähigen Blasten

in vitro natürlich in viel stärkerem Maße inkorporiert werden konnte als von den meist teilungsunfähigen kleinen Lymphozyten und den weit geringer mitotisch aktiven großen und mittleren Zellen.

Diese Möglichkeit ließ sich durch den Ansatz S 47 völlig ausschließen, der 14 Tage nach Vivomarkierung durchgeführt wurde, und lag auch bei S 48 (2 Tage nach Vivomarkierung) und S 56 (3 Tage nach Vivomarkierung) nicht nahe, da appliziertes ^3H -Thymidin nach Untersuchungen von Cleaver (35) bereits nach wenigen Stunden katabolisiert ist.

Die andere Möglichkeit, daß aus zugrundegehenden Zellen frei werdendes ^3H -Nucleosid von Blasten im Sinne einer Reutilisation (92) inkorporiert wurde, ließ sich dadurch widerlegen, daß sich zu frühesten Kulturterminen ohne nachweisbaren Zelluntergang die höchsten Markierungsindices der Blastenfraktion fanden. Zum anderen war die Markierungsintensität in den Blasten der frühen Termine am stärksten. Dies wäre bei alleiniger Markierung durch Reutilisation frei werdender Nucleoside nicht möglich gewesen.

Ein deutlicher Unterschied bestand außerdem zwischen dem Verhalten der Blasten bis zur 48.h (2. Tag) gegenüber dem Verhalten der Blasten ab der 72.h (3.Tag), denn zum Zeitpunkt der Haupttransformation wurden die Markierungsindices von Blasten und kleinen Lymphozyten fast kongruent (S 56) bzw. wiesen nur unsignifikante Unterschiede auf (S 33, S 57, S 59).

Nun war nach dem quantitativen Anstieg des Blastenanteils in unseren Ansätzen ebenso wie nach den Ergebnissen von Rowlands (168) und Valentine (221) erst von der 72. Stunde an mit einem sicheren transformatorischen PHA-Effekt zu rechnen.

Es gab also offenbar zwei Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen auftretende entsprach eventuell dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher handelte es sich aber nicht um echte Blasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender Zellen von Blastengröße mit in vivo erworbener hoher Markierungsintensität, was als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu deuten war.

Diese Zellfraktion machte zu frühen Kulturterminen maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus. Sie zeigte zu frühen Kulturzeitpunkten, bei S 57 noch am Tag 3, den beschriebenen, hoch über dem Index der kleinen Fraktion liegenden Markierungsindex.

Auffallend war - besonders bei S 56 und S 57 -, daß der Markierungsindex der großen Lymphozyten ebenfalls deutlich über dem der kleinen lag und zu den frühesten Kulturterminen dem der Blasten am nächsten kam.

Die Ähnlichkeit des Verhaltens dieser großen Lymphozyten zu den "Frühblasten" durfte als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß es sich hier um eine ähnliche, rasch umsetzende Zellfraktion ohne eindeutige PHA-Abhängigkeit handelte.

Demgegenüber mußten die späteren Blasten von der 72.h an als transformierte Zellen unter PHA-Einfluß angesehen werden. Entsprechend machten sie erst zu späteren Terminen (3. - 4.Tag) einen quantitativen Sprung durch und erreichten 30 - 40 %igen Anteil an der Kulturzellzahl. Es fanden sich dann nur kleine oder gar keine (S 56 Tag 3 und 4) Unterschiede des Markierungsindex zwischen Blasten und kleinen Lymphozyten.

Dennach rekrutierte sich die Population der PHA-Blasten aus Lymphozyten mit durchschnittlichem Markierungs- und Umsatzverhalten. Die gelegentlich gering über dem Markierungsindex der kleinen Lymphozyten liegenden Werte erklärten sich leicht aus der Durchsetzung dieser Population mit den vorbeschriebenen hochmarkierten "Frühblasten".

Für die Abkunft der zeitgerechten PHA-Blasten im Gegensatz zu den "Frühblasten" von durchschnittlich markierten kleinen Lymphozyten sprach überdies, daß nur zum Zeitpunkt ihres maximalen Auftretens in der Mehrzahl der Ansätze die Markierungsintensität beider Fraktionen in vergleichbarer Größenordnung lag.

Bei den mittleren Lymphozyten zeigten Markierungsindex und Absolutzahl der markierten Zellen in allen Ansätzen ein der kleinen Fraktion analoges Verhalten. Die Markierungsintensität fiel dagegen zum 3. - 4. Tag analog dem Blasten-mean-grain-count stärker ab. Eine größere Beteiligung der mittleren Fraktion an der Blastenbildung war wie ausgeführt aufgrund der geringen Dynamik der Zellbewegungen unwahrscheinlich. Das Markierungsverhalten dieser Fraktion, speziell der Abfall aller drei Markierungsparameter zum Zeitpunkt der Haupttransformation, ließ darauf schließen, daß ein unbedeutender Prozentsatz sich unter PHA-Wirkung zu Blasten umsetzender kleiner Lymphozyten in Form von "transitional cells" (61, 175) in dieser Fraktion erschien.

Bei den großen Lymphozyten fand sich in weitgehender Analogie zum Blastenmarkierungsverhalten im Kulturverlauf bei S 34 und S 56 ein konstanter Abfall des Markierungsindex, der Absolutzahl der markierten Zellen und der Markierungsintensität. Bei S 57 zeigte sich ein

Anstieg der ersten beiden Parameter zwischen Tag 0 und 3, der Abfall erfolgte erst zwischen Tag 3 und 4. Dieses abweichende Verhalten war wohl weitgehend durch die in diesem Ansatz allgemein etwas verzögert zwischen Tag 3 und 4 einsetzenden Umsatzvorgänge bedingt.

Insgesamt erlaubte es aber dieses Markierungsverhalten in Korrelation mit der geringen Dynamik der Zellbewegungen eine Eigenbeteiligung der großen Fraktion an der Blastopoese weitgehend auszuschließen.

Der hohe Markierungsindex und die hohe Markierungsintensität der großen Lymphozyten zu frühen Terminen in Analogie zum Blastenmarkierungsverhalten sprachen wie ausgeführt dafür, daß es sich bei den "Frühblasten" nicht um echte Immunoblasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender stark markierter großer Lymphozyten mit blastoidem Charakter handelte, zumal da eine Spontantransformation unwahrscheinlich, eine PHA-abhängige Transformation frühestens ab Tag 2 zu erwarten war. Der Abfall des Markierungsindex im Kulturverlauf zum Haupttransformationstermin in Korrelation mit der kinetischen Trägheit der großen Lymphozyten erklärte sich dann durch das Auftreten von "transitional cells" aus dem Bereich der kleinen Lymphozyten (61, 175), die sich ab der 72. h unter PHA-Wirkung in zunehmendem Ausmaß zu Blasten umsetzten. Diese Zellen waren wie beschrieben in der Regel schwächer oder nicht markiert.

Eine stärkere Beteiligung der großen Lymphozyten an der Blastopoese konnte also weitgehend ausgeschlossen werden. Ein gewisser Prozentsatz unter PHA-Wirkung zu Blasten sich umsetzender kleiner Lymphozyten erschien in Form von

"transitional cells" (61, 175) auf dem Weg der Blastopoese in dieser Fraktion.

Da wie ausgeführt die Mehrzahl der Lymphknoten jedenfalls bis zum Tag 4 aus der Blastopoese stammte, zeigte sich an ihrem Markierungsverhalten - Anstieg des Markierungsindex und der Absolutzahl der markierten Zellen zwischen Kulturbeginn und Beginn der Haupttransformation (S 35, S 57) und Abfall beider Parameter im Rahmen der Haupttransformation zwischen Tag 3 und 4 (S 57) bzw. 2 und 4 (S 56) - daß zunächst vorzugsweise stärker markierte kleine Lymphozyten zur Transformation kamen, während im Verlauf der Haupttransformation der Anteil schwächer und nicht markierter kleiner Zellen an der Blastopoese größeren Umfang annahm.

Der Zelluntergang erfolgte vermutlich über Involution von in ihrer Blastenentwicklungstendenz gestörten Lymphozyten im Rahmen der Blastopoese. Die Morphologie zeigte jedenfalls, daß Blasten eher über Autolyse denn Zellschrumpfung zugrunde gingen.

4.15 Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten: Normallymphozyten sprechen frühzeitig, gleichmäßig und ohne Störung ihrer Vitalität auf PHA an.

Vorzugsweise kleine Lymphozyten setzen sich unter Wirkung dieses Antigens zu Immunoblasten um. Daneben gehen in geringem Umfang im Sinne eines "self-feeding" (113) Blasten aus Blasten hervor. Die Haupttransformation erfolgt am 3. und 4. Kulturtag. Stark markierte Zellen setzen sich früher als schwächer und nicht markierte zu Blasten um.

Es gibt zwei Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen auftretende entspricht eventuell dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher handelt es sich bei diesen Zellen aber nicht um echte Immunoblasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender Zellen von Blastengröße mit in vivo erworbener hoher Markierungsintensität, was wohl als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu deuten ist. Diese Fraktion der "Frühblasten" macht zu Kulturbeginn maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus. Ihr Markierungsindex liegt hoch über dem der kleinen Lymphozyten.

Die zweite Immunoblastenfraktion entstammt unter PHA-Einfluß etwa von der 72.h an transformierenden Zellen und erreicht um den 3. - 4. Tag 30 - 40 %igen Anteil an der Kulturzellzahl. Sie leitet sich von kleinen Lymphozyten mit durchschnittlichem Markierungs- und Umsatzverhalten ab, wobei stärker markierte Zellen früher zum Umsatz kommen als schwächer und nicht markierte.

Mittlere und große Lymphozyten beteiligen sich allenfalls in geringem Ausmaß an der Blastopoese, wobei sich die große Fraktion noch träger verhält als die mittlere. Ein unbedeutender Prozentsatz unter PHA-Wirkung zu Immunoblasten sich umsetzender kleiner Lymphozyten erscheint in Form von "transitional cells" (61, 175) in beiden Fraktionen.

Die Mehrzahl der Pyknosen bis zum Tag 4 stammt aus der Blastopoese. Der Zelluntergang erfolgt ziemlich sicher über Involution von in ihrer Blastenentwicklungstendenz gestörten T-Zellen.

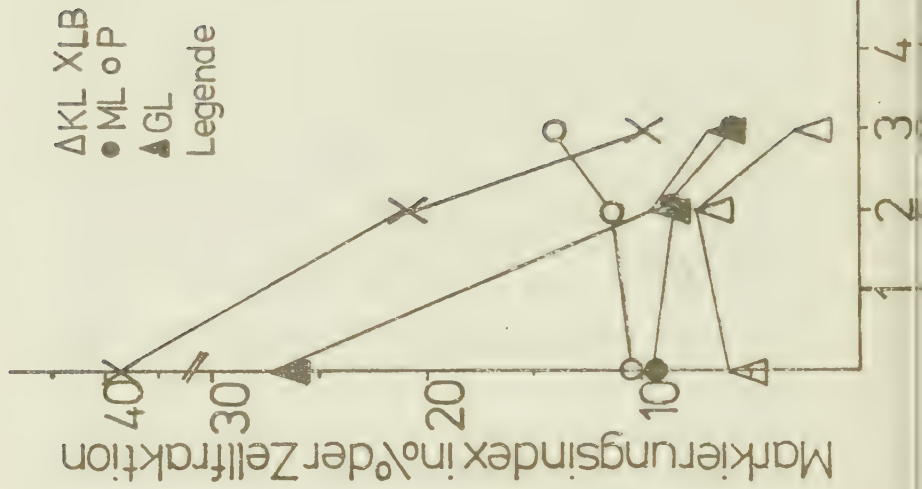
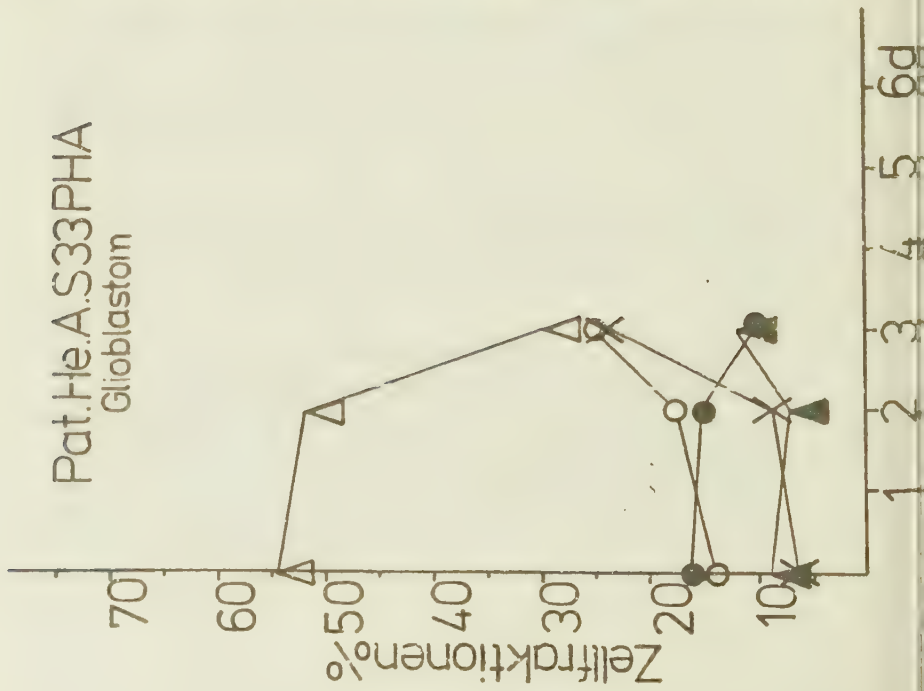


Tabelle I Pat. He.A. S 33 PHA Glioblastom

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	2	3
KL=kleine Lymphozyten	25	23	19
ML=mittlere Lymphozyten	34	39	23
GL=große Lymphozyten	45	37	25
LB=Lympho- blasten	62	42	29
P=Pyknosen	8	13	13

Tabelle II Pat. He.A. S 33 PHA Glioblastom

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	2	3
KL=kleine Lymphozyten	32	38	9
ML=mittlere Lymphozyten	16	13	6
GL=große Lymphozyten	23	7	7
LB=Lympho- blasten	26	18	24
P=Pyknosen	16	20	35

Tabelle III Pat. He.A. S 33 PHA Glioblastom

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	2	3
Freie Zellen	2,29	2,36	25,58
Zellen in Agglutinat	97,71	97,64	74,42

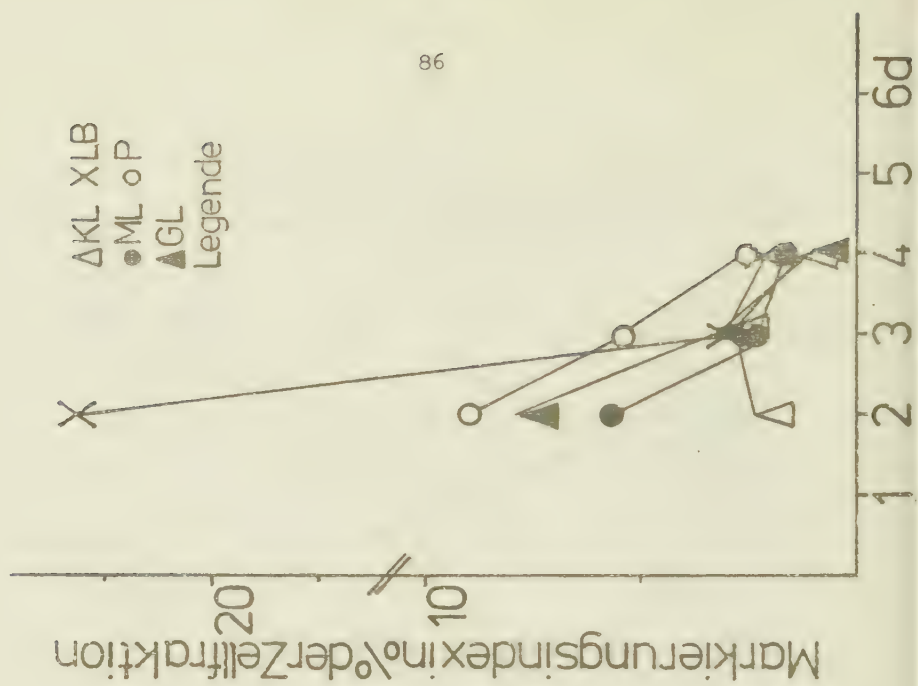
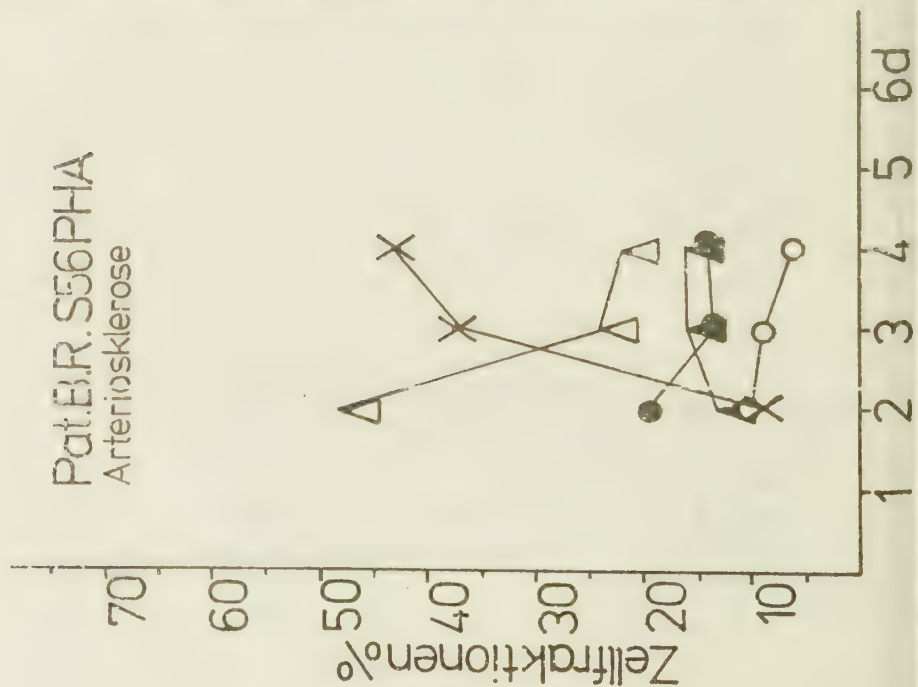


Tabelle I Pat. B.R. S 56 PHA Arteriosklerose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	2	3	4
KL=kleine Lymphozyten	17	24	23
ML=mittlere Lymphozyten	27	24	26
GL=große Lymphozyten	36	23	20
LB=Lympho- blasten	59	36	25
P=Pyknosen	10	12	10

Tabelle II Pat. B.R. S 56 PHA Arteriosklerose

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	2	3	4
KL=kleine Lymphozyten	11	7	3
ML=mittlere Lymphozyten	11	3	2
GL=große Lymphozyten	10	5	2
LB=Lympho- blasten	25	11	10
P=Pyknosen	9	5	1

Tabelle III Pat. B.R. S 56 PHA Arteriosklerose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	2	3	4
Freie Zellen	11,05	2,44	2,80
Zellen in Agglutinat	88,95	97,56	97,20

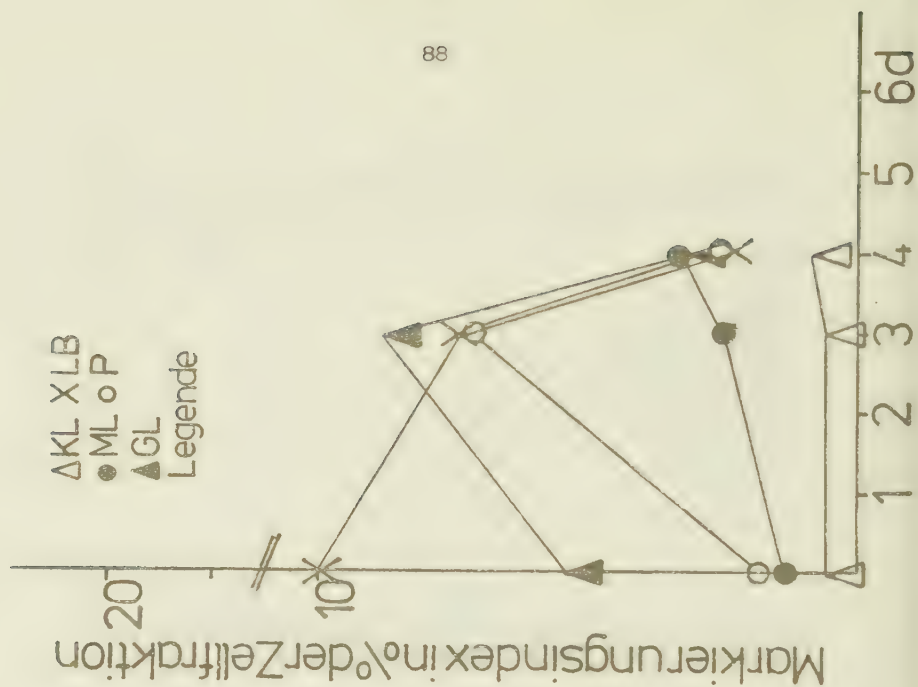
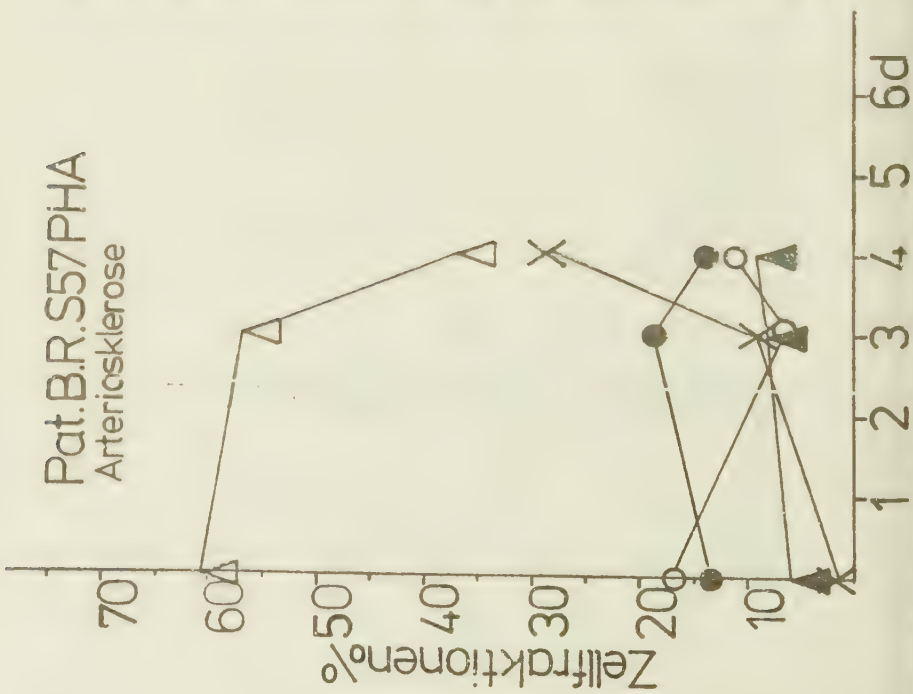


Tabelle I Pat. B.R. S 57 PHA Arteriosklerose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4
KL=kleine Lymphozyten	14	14	14
ML=mittlere Lymphozyten	26	22	14
GL=große Lymphozyten	27	20	21
LB=Lympho- blasten	32	30	28
P=Pyknosen	10	11	9

Tabelle II Pat. B.R. S 57 PHA Arteriosklerose

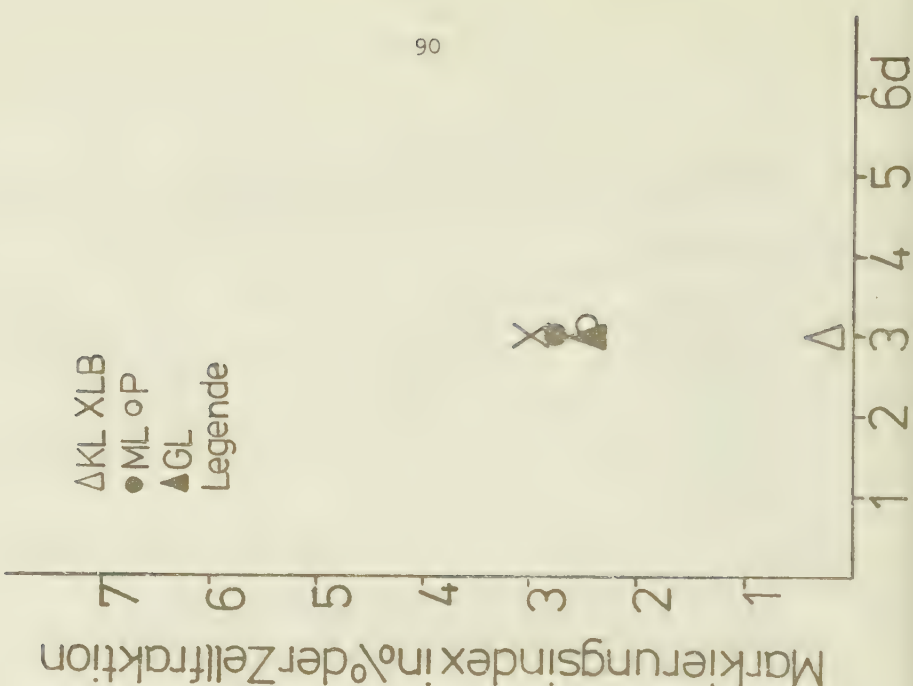
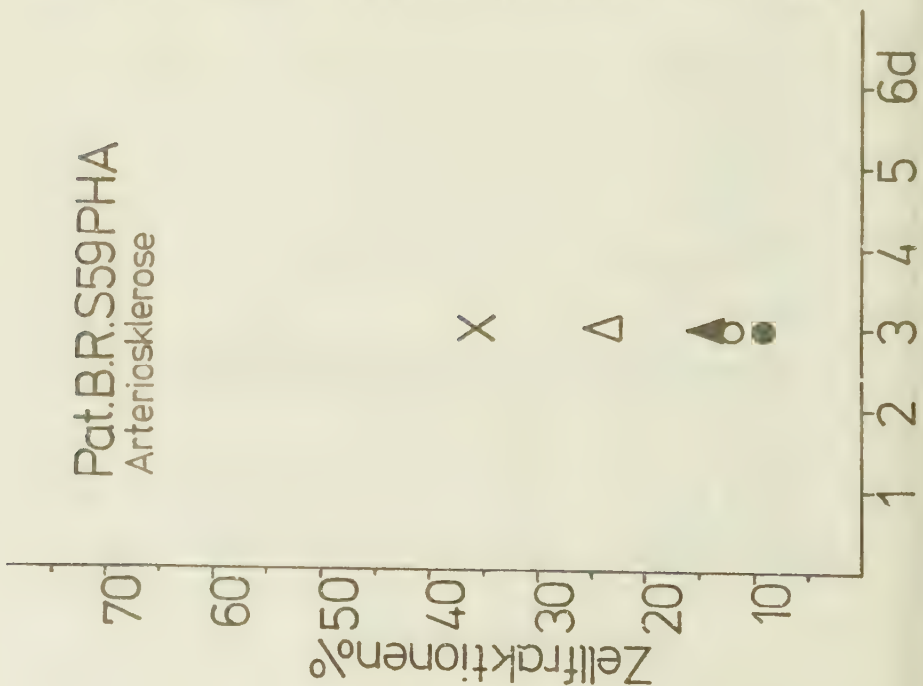
Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4
KL=kleine Lymphozyten	4	4	3
ML=mittlere Lymphozyten	2	5	5
GL=große Lymphozyten	4	7	3
LB=Lympho- blasten	2	7	7
P=Pyknosen	3	5	3

Tabelle III Pat. B.R. S 57 PHA Arteriosklerose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4
Freie Zellen	12,22	12,12	6,61
Zellen in Agglutinaten	87,78	87,88	93,39



ΔKL XLB
 ●ML oP
 ▲GL
 Legende

Tabelle I Pat. B.R. S 59 PHA Arteriosklerose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	3
KL=kleine Lymphozyten	16
ML=mittlere Lymphozyten	20
GL=große Lymphozyten	25
LB=Lympho- blasten	31
P=Pyknosen	11

Tabelle II Pat. B.R. S 59 PHA Arteriosklerose

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	3
KL=kleine Lymphozyten	4
ML=mittlere Lymphozyten	3
GL=große Lymphozyten	4
LB=Lympho- blasten	11
P=Pyknosen	3

Tabelle III Pat. B.R. S 59 PHA Arteriosklerose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	3
Freie Zellen	2,72
Zellen in Agglutinaten	97,28

4.2 Chronische lymphatische Leukämie

4.21 Patient Hu.J.:

4.211 Zellbewegungen: (s. Graphen S 28, S 30) Die kleinen Lymphozyten, welche zu frühen Kulturzeiten bei S 28 eine relative Konstanz ihres prozentualen Anteils an der Gesamtzellzahl. Abweichend davon findet sich in S 30 zwischen dem Tag 0 und dem Tag 3 ein deutlichen Anstieg der kleinen Fraktion von einem relativ niedrigen Nullwert (34,39 %) auf 50,96 %. Damit korreliert ein nahezu spiegelbildlicher Abfall der mittleren Lymphozyten von 30,42 % auf 18,52 %. Zwischen Tag 3 und 4 fällt der relative Anteil der kleinen Lymphozyten sowohl in S 28 (49,78 % auf 40,35 %) als auch in S 30 (50,96 % auf 39,16 %) deutlich ab. Im Ansatz S 30 setzt sich dieser Abfall kontinuierlich - zwischen Tag 6 und 7 mit ähnlicher Deutlichkeit (34,33 % auf 23,34 %) - bis zum Kulturende fort.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten an der Gesamtzellzahl hält sich von der beschriebenen Ausnahme bei S 30 abgesehen bei geringfügigen Schwankungen um 10 % in beiden Ansätzen im gesamten Kulturverlauf relativ konstant.

Analoges Verhalten zeigt die Fraktion der großen Lymphozyten, wobei die Schwankungen ihres prozentualen Anteils mit 5 % und weniger noch geringer sind als die der mittleren Fraktion.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten an der Gesamtzellzahl steigt von Kulturbeginn bis Kulturende in beiden Ansätzen kontinuierlich an und erreicht am Kulturende seinen höchsten Wert. Die stärksten Zunahmen finden sich korrelierend mit den deutlichsten Abnahmen der kleinen

Fraktion zwischen dem 3. und 4. und dem 6. und 7. Tag. Bei S 28 zeigt sich keine Blastenvermehrung zwischen Tag 3 und 4, dagegen ein deutlicher Anstieg des relativen Pyknosenanteils.

Der relative Anteil der Pyknosen ist bis zum Tag 4 in beiden Ansätzen mit maximal 14,45 % (S 28 Tag 4) an der Gesamtzellzahl sehr klein. Er steigt dann in S 30 vom Tag 4 ab kontinuierlich bis zum Kulturende an, wo die Pyknosen mit 34,08 % die stärkste Zellfraktion bilden.

4.212 Markierungsverhalten: (s. Graphiken und Tabellen I und II S 28, S 30) Der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten fällt in beiden Ansätzen zwischen Tag 0 und 3 deutlich ab und bleibt dann im weiteren Kulturverlauf relativ konstant. Die Absolutzahl der markierten Zellen dagegen fällt zwischen Kulturbeginn und Kulturende kontinuierlich ab. Die Markierungsintensität zeigt relative Konstanz im Kulturverlauf und bei S 30 am Tag 8 einen deutlich über den Ergebnissen der Vortermine gelegenen Wert.

Der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten fällt bei S 28 zwischen Tag 0 und 3, bei S 30 zwischen Tag 3 und 4 deutlich ab. Er steigt bei S 28 zwischen Tag 3 und 4 nochmals an, während er bei S 30 nach dem Abfall zwischen Tag 4 und 7 relativ konstant bleibt und erst zum Tag 8 wieder stärker fällt. Die Absolutzahl der markierten Zellen zeigt analoges Verhalten in beiden Ansätzen, während die Markierungsintensität zunächst von einem hohen Nullwert ausgehend zum Tag 3 abfällt, dann im Kulturverlauf konstant bleibt und bei S 30 am Tag 8 analog der kleinen Fraktion einen deutlich über den Ergebnissen der Vortermine liegenden Wert aufweist.

Markierungsindex und Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten zeigen in beiden Ansätzen deutlichen Abfall zum Tag 3, Wiederanstieg zum Tag 4, bei S 30 erneuten Abfall zum Tag 6, Wiederanstieg zum Tag 7 und Abfall zum Tag 8. Die Markierungsintensität fällt vom Tag 0 zum Tag 4 hin ab und bleibt dann im Kulturverlauf relativ konstant.

Alle Parameter des Markierungsverhaltens der Lymphoblasten zeigen bis zum Tag 4, die Markierungsintensität sogar im ganzen Kulturverlauf, analoges Verhalten zur großen Fraktion. Markierungsindex und Absolutzahl der markierten Blasten steigen dann bei S 30 gegenläufig zum Verhalten dieser Parameter bei der großen Fraktion zwischen Tag 4 und 6 leicht an, fallen zum Tag 7 ab und weisen zum Tag 8 nochmals einen deutlichen Anstieg auf.

Markierungsindex und Absolutzahl der markierten Funknoson zeigen bei S 30 einen kontinuierlichen Abfall zwischen Tag 0 und 8. Bei S 28 erfolgt nach Abfall zwischen Tag 0 und 3 ein deutlicher Wiederanstieg zum Tag 4. Die Markierungsintensität dieser Fraktion bleibt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

4.213 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III S 28, S 30)
Der Prozentsatz der in Agglutinaten liegenden Zellen erreicht in beiden Ansätzen erst am Tag 3 mit Normallymphozyten vergleichbare Werte von mehr als 85 %. Dieser Prozentsatz fällt bei S 28 deutlich bereits zwischen Tag 3 und 4 ab, bei S 30 zeigt er bei geringem konstantem Abfall relative Konstanz im Kulturverlauf.

4.214 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 28, S 30): Die verhältnismäßig langsame Bildung von Zellagglutinat in beiden Ansätzen wies auf ein verzögertes Ansprechen von CLL-Lymphozyten auf PHA hin. Bei Normalpatienten fanden sich wie ausgeführt schon bei der Null-ernte - also nur 2 h nach PHA-Zusatz - mehr als 85 % aller Zellen in Agglutinat. Gestörte Vitalbedingungen der Lymphozyten unter PHA-Wirkung konnten aufgrund der relativ geringen Schwankungen des verzögert erreichten Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf weitgehend ausgeschlossen werden (s.auch Diskussion Normalpatienten 4.14).

CLL-Lymphozyten sprachen also gleichmäßig verzögert, allerdings ohne wesentliche Einschränkung ihrer Vitalität auf PHA an.

Der zeitliche Zusammenfall der deutlichsten Verminderung des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten mit den stärksten Gewinnen der Immunoblasten ließ auch bei der CLL einen direkten Zusammenhang dieser beiden morphologischen Zelltypen im Sinne eines Übergangs von kleinen Lymphozyten in Immunoblasten annehmen. Die Verluste an kleinen Lymphozyten zwischen Tag 3 und 4 sowie 6 und 7 entsprachen quantitativ, wie die zugehörigen Graphiken zeigen (S 28, S 30), fast genau dem Zugewinn der Immunoblasten in diesen Zeiträumen.

Der direkte Zusammenhang beider morphologischer Fraktionen wurde zweitens durch die kontinuierliche Abnahme des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten zwischen Tag 3 und 8 bei konstanter Zunahme des relativen Immunoblastenanteils deutlich (S 30).

Im Gegensatz zu Normallymphozyten fand sich also bei CLL-Lymphozyten kein Haupttransformationstermin (s.oben 4.14), sondern eine am 3. Kulturtag einsetzende, bis zum Kulturende sich hinziehende verzögerte Transformation.

Diese Transformationsform schien durch die in der Einleitung beschriebene verminderte PHA-Ansprechbarkeit der CLL-T-Zellen bedingt zu sein (s.vorstehend 1.31).

Die am Tag 3 und 4 unter PHA-Wirkung zeitgerecht transformierenden kleinen Lymphozyten waren dann wohl im Sinne der Grundkrankheit in ihrer PHA-Ansprechbarkeit nicht oder nur wenig veränderte T-Zellen. Die Größe dieses Compartiments war der Malignität des B-zell-leukämischen Prozesses - als unmittelbarer klinischer Ausdruck kann das Ausmaß der peripheren Lymphozytose gewertet werden - umgekehrt proportional. Das heißt, daß der Transformationserfolg an den Tagen 3 und 4 umso größer war, je geringer die periphere Lymphozytose und damit die Malignität der Grundkrankheit ausgeprägt war. Im vorliegenden Fall betrug der Blastenprozentsatz am Tag 3 bei S 28 14,46 % und am Tag 4 14,12 %, bei S 30 12,14 % bzw. 17,0 %. (vgl. dazu die gleichen Termine bei Normalpatienten).

Bei den zu späten Terminen zu Immunoblasten sich umsetzenden kleinen Lymphozyten handelte es sich dann in der Mehrzahl möglicherweise um durch den Krankheitsprozeß vorgeschädigte T-Zellen, deren PHA-Ansprechbarkeit mehr oder weniger eingeschränkt war.

Ein weiterer Grund für die zu sehr späten Kulturterminen relativ hohen Gewinne der Immunoblastenfraktion war wohl die ab dem Tag 5, bedingt durch sich verschlechternde Lebensbedingungen in der Kultur, einsetzende natürliche

Zellinvolution. Sie führte zu einer Verminderung der Kulturzellzahl. So konnte möglicherweise der von antigen-stimulierten Zellen abgesonderte mitoseinduzierende Faktor MIF aus räumlichen Gründen besser zu nicht stimulierten T-Zellen gelangen und sie zur Mitstransformation anregen. Zu frühen Terminen war dieser Vorgang in CLL-Kulturen wegen der großen B- und geringen T-Zellzahl bei hohen Kulturzellzahlen wohl erheblich erschwert. Dieser Dilutionseffekt wäre andererseits eine weitere Erklärungsmöglichkeit für die teilweise Spätstransformation.

Die Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten wies in beiden Ansätzen keine wesentlich größere Amplitude als 5 - 10 % auf. Die Größenordnung dieser Bewegungen sprach gegen eine deutlichere Beteiligung dieser beiden Zellfraktionen an der Blastopoese, wobei sich wie bei den Normallymphozyten die große Fraktion noch träger verhielt als die mittlere.

Ebenso wie bei den Normallymphozyten (s.4.14) sprachen geringfügige gegenläufige Bewegungen zwischen kleiner, mittlerer und großer Fraktion für unbedeutende Zellübergänge zwischen diesen Fraktionen aus der kleinen in die mittlere, der mittleren in die große.

Da eine Eigenbeteiligung der großen und mittleren Lymphozyten an der Blastopoese weitgehend ausgeschlossen war, waren diese Bewegungen wahrscheinlich durch das Auftreten eines geringen Prozentsatzes zu Blasten transformierender kleiner Lymphozyten als "transitional cells" (61, 175) in diesen beiden Fraktionen bedingt.

Der hohe prozentuale Anteil mittlerer Lymphozyten bei relativ geringem prozentualen Anteil der kleinen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im Ansatz S 30 am Tage 0 war auf einen Auswertungsartefakt zurückzuführen. Infolge grober Projektion wurden wohl zahlreiche kleine Zellelemente zur mittleren Fraktion gezählt. Das gleiche gilt auch für den Ansatz S 28.

Die relative prozentuale Konstanz der Pyknosen zu frühen Terminen sprach gegen gestörte Vitalbedingungen der CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung. Bis zum Tag 4 stammten die meisten Pyknosen wahrscheinlich aus der Blastopoese, entstanden also durch Involution von Lymphozyten, die in ihrer Blastenentwicklungsstadien gestört waren. Dafür sprach auch der relativ deutliche Anstieg des Pyknosenanteils in S 28 zwischen Tag 3 und 4 von 8,64 % auf 14,45 % bei vollständig fehlenden Blastengewinnen im selben Zeitraum, während der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten deutlich abfiel. Es lag hier wohl eine kulturtechnisch bedingte Störung der Blastopoese vor. Dies ging auch aus der deutlichen Verminderung des Agglutinatprozentsatzes zwischen Tag 3 und 4 im selben Ansatz hervor. Da nämlich die Blastopoese unseren Beobachtungen entsprechend vor allem in Agglutinaten stattfand, mußte jede Störung letztlich zum Untergang ganzer Zellinseln und damit zum starken Abfall ihres prozentualen Anteils an der Zellverteilung führen.

Der Zelluntergang erfolgte wie bei Normallymphozyten wohl durch Involution ohne Transformation, während Blasten auch bei der CLL vorzugsweise durch Autolyse zugrunde gingen.

Ab dem 5. Tag (s.auch die übrigen CLL-Graphiken) setzte ein alle Zellfraktionen relativ gleichmäßig betreffender natürlicher Zelluntergang durch sich verschlechternde Lebensbedingungen in der Kultur ein. Dies drückte sich im Ansatz S 30 durch konstanten Anstieg des relativen Pyknosenanteils zwischen Tag 4 und 8 aus.

In beiden Ansätzen zeigten die kleinen Lymphozyten bezüglich Markierungsindex und Absolutzahl markierter Zellen zwischen Tag 0 und 3 einen deutlichen Abfall. Der Markierungsindex und die Absolutzahl markierter Blasten fielen im selben Zeitraum ebenfalls deutlich ab.

Dieses Markierungsverhalten ließ erkennen, daß höher markierte Zellen wie bei Normalpatienten früher zum Umsatz kamen als schwächer und nicht markierte Zellen, deren Anteil an der Blastopoese erst ab Tag 3 deutlich zunahm.

Zwischen Tag 3 und 4 bei S 28 und Tag 3 und 8 bei S 30 kam es insgesamt zu einem Wiederanstieg des Blastenmarkierungsindex und der Absolutzahl markierter Immunoblasten. Beide Parameter erreichten am Tag 8 ihren höchsten Wert. Gleichzeitig blieb der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten relativ konstant, bei weiterem kontinuierlichem Abfall der Absolutzahl markierter kleiner Zellen.

Im Rahmen der verzögerten Transformation setzten sich also vorzugsweise markierte kleine T-Zellen erfolgreich zu Immunoblasten um - besonders ausgeprägt zwischen Tag 7 und 8 (S 30).

Die Konstanz des Markierungsindex der kleinen Fraktion bei kontinuierlichem Abfall der Absolutzahl markierter

kleiner Lymphozyten ließ des weiteren erkennen, daß die kleinen Lymphozyten zu späten Terminen sowohl Zellverluste durch Transformation markierter Elemente zu Immunblasten als auch durch Involution vorzugsweise nicht markierter Elemente zu Pyknosen aufwiesen.

Die etwas höhere Markierungsintensität kleiner, aber auch mittlerer Lymphozyten am Tag 8 war wahrscheinlich durch größere Zelldurchmesser infolge günstigerer räumlicher Verhältnisse für die Einzelzelle bei involutionsabhängiger Verminderung der Kulturzellzahl bedingt, wodurch bis dahin verborgene Markierung zum Vorschein kam und mitgewertet wurde.

Das in beiden Ansätzen zu beobachtende Phänomen des relativ hohen Blastenmarkierungsindex zu Kulturbeginn bedarf spezieller Diskussion: zunächst läge die Möglichkeit nahe, daß frei zirkulierendes Isotopenmaterial trotz der oben geschilderten methodischen Vorkehrungen von teilungsfähigen Blasten in vitro natürlich in viel stärkerem Maße inkorporiert werden konnte als von den meist teilungsunfähigen kleinen Lymphozyten und den weit geringer mitotisch aktiven großen und mittleren Zellen. Diese Möglichkeit war allerdings wenig wahrscheinlich, da nach den Untersuchungen von Cleaver (44) appliziertes ^3H -Thymidin bereits nach wenigen Stunden katabolisiert ist und die vorliegenden Ansätze wenigstens 5 Tage nach Absetzen der Vivomarkierung durchgeführt wurden.

Die andere Möglichkeit, daß aus zugrunde gehenden Zellen frei werdendes ^3H -Nucleosid von Blasten im Sinne einer Reutilisation (92) inkorporiert wurde, ließ sich dadurch widerlegen, daß sich diese hohen Blastenmarkierungsindices eben zu frühesten Kulturterminen ohne nachweisbaren Zelluntergang fanden.

Somit blieb wie bei Normallymphozyten die einzige Interpretationsmöglichkeit die, daß diese zu frühen Kulturterminen auftretenden blastoiden Zellen Angehörige einer primär in vivo hochmarkierten Fraktion waren.

Da wie ausgeführt sowohl in unseren Ansätzen als auch nach den Ergebnissen von Rowlands (168) und Valentine (221) erst von der 72.h an mit einem sicheren transformatorischen PHA-Effekt zu rechnen war, hatten wir es bei der CLL offenbar mit drei Blastenfraktionen zu tun.

Die erste, zu frühen Terminen auftretende entsprach eventuell dem Ergebnis einer Spontantransformation hochmarkierter T-Zellen. Wahrscheinlich handelte es sich aber eher wie bei Normallymphozyten nicht um echte Blasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender Zellen von Blastengröße mit in vivo erworbener hoher Markierungsintensität, was als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu deuten war. Diese Zellfraktion machte zu frühen Kulturzeitpunkten maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus.

Auffallend war in beiden Ansätzen, daß der Markierungsindex der großen Lymphozyten zu frühen Terminen ebenfalls sehr hoch lag und dem der "Frühblasten" am nächsten kam. Die Ähnlichkeit des Verhaltens dieser beiden Zellpopulationen durfte als weiterer Hinweis dafür gewertet werden, daß es sich hier um eine ähnliche, rasch umsetzende Zellfraktion ohne eindeutige PHA-Abhängigkeit handelte.

Dafür sprach auch der zu frühen Terminen sowohl in S 28 als auch in S 30 sehr hohe Pyknosenmarkierungsindex. Im Gegensatz zu Normallymphozyten ging offensichtlich ein Teil dieser zu frühen Terminen auftretenden hochmarkierten Zellen durch Involution zugrunde.

Demgegenüber mußten die am 3. Tag auftretenden Blasten als Ergebnis der PHA-abhängigen Transformation kleiner Lymphozyten gewertet werden. Der Markierungsindex lag hier niedriger als bei den "Frühblasten", aber doch deutlich höher als bei Normalblasten zum gleichen Zeitraum (s.dort).

Die dritte Blastenfraktion entsprach dem Transformationsergebnis kleiner T-Zellen, die zu späten Terminen verzögert zum Umsatz kamen. Sehr viele dieser Zellen waren ebenfalls markiert, wie der Anstieg des Blastenmarkierungsindex zeigt, die Markierungsintensität war allerdings geringer als bei den zu frühen Terminen gefundenen blastoiden Zellen.

Das Markierungsverhalten der großen Lymphozyten zeigte in beiden Ansätzen bis zum Tag 4 weitgehende Analogie zu dem der Blasten. Der hohe Markierungsindex und die hohe Markierungsintensität der großen Lymphozyten zu frühen Terminen in Analogie zum Blastenmarkierungsverhalten sprachen wie ausgeführt dafür, daß es sich bei den "Frühblasten" nicht um echte Immunblasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender stark markierter großer Lymphozyten mit blastoidem Charakter handelte, zumal da eine Spontantransformation unwahrscheinlich, eine PHA-abhängige Transformation frühestens ab Tag 2 zu erwarten war.

Der Abfall des Markierungsindex der großen Lymphozyten in beiden Ansätzen zum Tag 3 erklärte sich dann durch das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) aus dem Bereich der kleinen Lymphozyten, die ab der 72. h unter PHA-Wirkung in zunehmendem Ausmaß zum Umsatz kamen. Diese Zellen waren wie beschrieben in der Regel schwächer oder nicht markiert.

Zu späten Terminen verhielten sich im Ansatz S 30 die Markierungsparameter der großen Fraktion genau gegenläufig zu denen der Blastenfraktion. Zunächst kam es zwischen Tag 4 und 6 bei Abfall des Markierungsindex der großen Fraktion zu einem Anstieg des Markierungsindex der Blastenfraktion. Bei relativer Konstanz des Immunoblastenmarkierungsindex zwischen Tag 6 und 7 stieg der Markierungsindex der großen Fraktion an, um bei steilem Anstieg des ersteren zwischen Tag 7 und 8 deutlich abzufallen. Dies sprach für ein Auftreten von "transitional cells" (61, 175) im Rahmen der verzögerten Transformation. Am 7. Tag als Übergangsformen in der großen Fraktion erscheinene T-Zellen hatten sich am 8. Tag endgültig zu Blasten umgesetzt.

Markierungsindex und Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten verhielten sich in S 28 (s. Graphik und Tabelle II) analog den gleichen Parametern der großen Fraktion. In S 30 war das Markierungsverhalten der mittleren Fraktion dem der großen gegenläufig, d.h. am 3. bzw. 6. Tag in der mittleren Fraktion erscheinende "transitional cells" (61, 175) tauchten am 4. bzw. 7. Tag in der großen Fraktion auf und hatten sich am 6. bzw. 8. Tag endgültig zu Blasten umgesetzt.

Markierungsindex und Absolutzahl der markierten Pyknosen fielen bei S 28 zwischen Tag 0 und 3 ab, um zwischen Tag 3 und 4 wieder anzusteigen. Dies sprach wie bereits bei den Zellbewegungen erörtert für eine Störung der Blastopoese zu diesem Zeitpunkt. Es fand sich bekanntlich zwischen Tag 3 und 4 bei fehlenden Blastengewinnen ein mit dem Abfall des prozentualen Anteils der kleinen Fraktion korrelierender deutlicher Anstieg des relativen Pyknosenanteils. Zahlreiche markierte T-Zellen erfuhren also im Rahmen dieser Störung eine Involution ohne Transformation.

Bei S 30 fielen diese beiden Parameter von hohem Niveau zwischen Tag 0 und 8 kontinuierlich ab. Dies gestattete den Schluß, daß ein Teil der zu frühen Terminen auftretenden hochmarkierten ~~großen Zellen bei geringen absoluten Zellverlusten zugrunde gingen~~. Der konstant fallende Markierungsindex zwischen Tag 3 und 8 bei gleichzeitiger kontinuierlicher Zunahme des relativen Pyknosenanteils wies im Zusammenhang mit dem steigenden Blastenmarkierungsindex bei gleichzeitiger Zunahme der Blastenfraktion darauf hin, daß im Rahmen der verzögerten Transformation in steigendem Umfang markierte Zellen zur Transformation kamen, während nicht markierte größere Tendenz zur Involution zeigten.

Pat. Hu. J. S28 PHA CLL

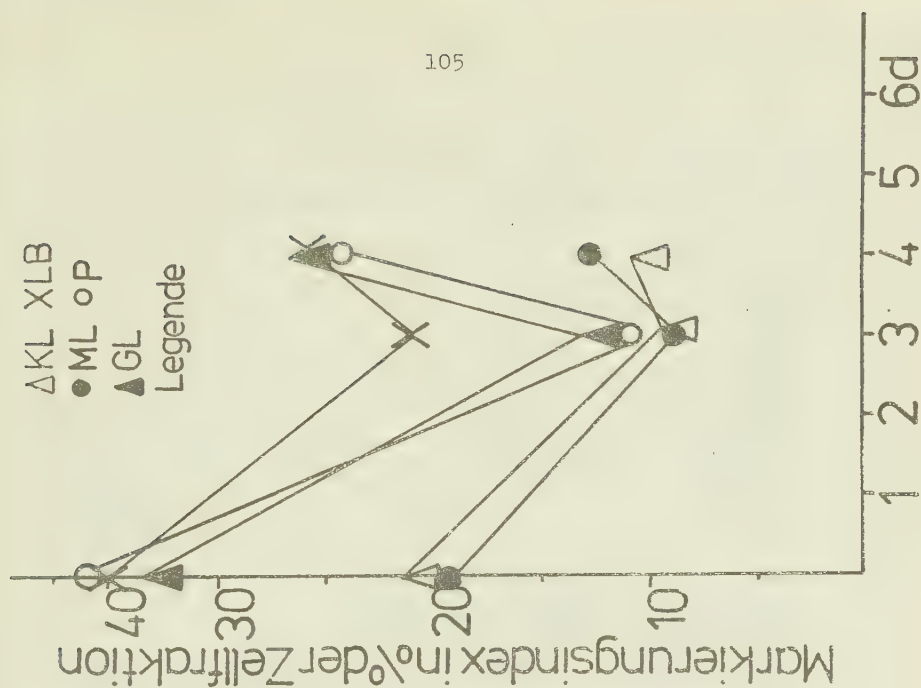
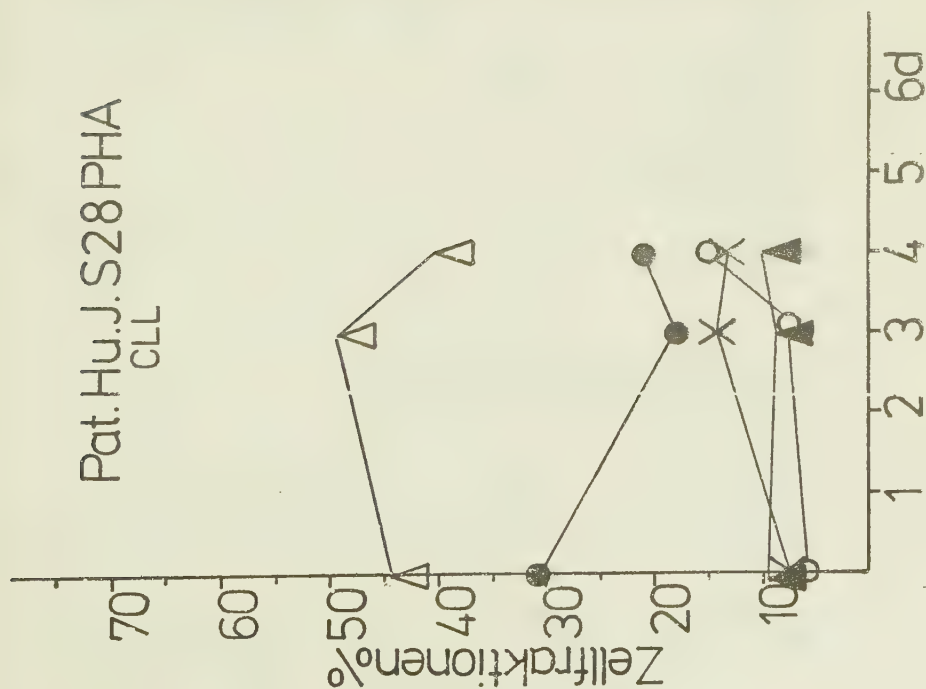


Tabelle I Pat. Hu.J. S 28 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4
KL=kleine Lymphozyten	38	39	32
ML=mittlere Lymphozyten	58	35	30
GL=große Lymphozyten	93	75	25
LB=Lympho- blasten	118	42	56
P=Pyknosen	12	11	11

Tabelle II Pat. Hu.J. S 28 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4
KL=kleine Lymphozyten	97	41	44
ML=mittlere Lymphozyten	60	16	27
GL=große Lymphozyten	35	12	27
LB=Lympho- blasten	37	11	44
P=Pyknosen	25	10	35

Tabelle III Pat. Hu.J. S 28 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4
Freie Zellen	19,88	7,89	18,05
Zellen in Agglutinat	80,12	92,11	81,95

Pat. Hu. J. S30PHA C1LL

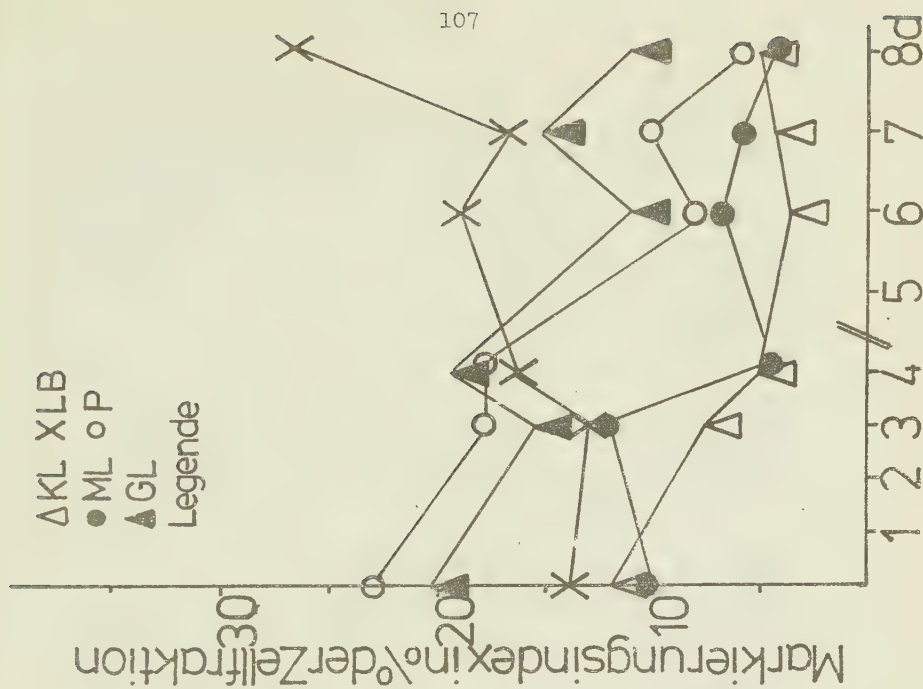
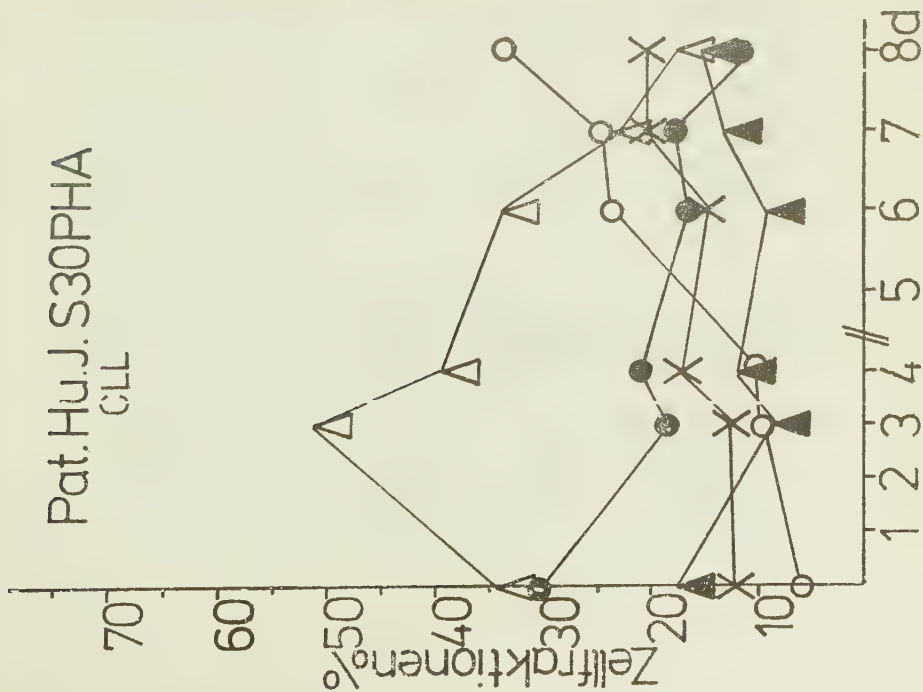


Tabelle I Pat. Hu.J. S 30 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kennzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4	6	7	8
KL=kleine Lymphozyten	21	29	32	24	22	42
ML=mittlere Lymphozyten	64	35	34	24	27	77
GL=große Lymphozyten	64	24	35	37	22	39
LB=Lympho- blasten	72	21	26	26	20	22
P=Pyknosen	14	13	11	11	19	10

Tabelle II Pat. Hu.J. S 30 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4	6	7	8
KL=kleine Lymphozyten	43	37	20	12	10	9
ML=mittlere Lymphozyten	32	23	11	11	11	5
GL=große Lymphozyten	35	14	22	10	20	18
LB=Lympho- blasten	20	16	28	30	28	54
P=Pyknosen	15	17	20	19	26	20

Tabelle III Pat. Hu.J. S 30 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4	6	7	8
Freie Zellen	52,99	3,18	3,95	15,71	11,06	17,11
Zellen in Agglutinat	47,01	96,82	96,05	84,29	88,94	82,89

4.22 Patient R.A.:

4.221 Zellbewegungen: (s. Graphiken S 36, S 38) Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten fällt im Ansatz S 36 zwischen Tag 3 und 4 mäßig, zwischen Tag 4 und 5 steil ab. Im Ansatz S 38 zeigt der relative Anteil kleiner Lymphozyten einen steilen Abfall zwischen Tag 3 und 5, der in einen kontinuierlichen geringgradigen Abfall zwischen Tag 5 und dem Kulturende übergeht.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen im Kulturverlauf bei geringfügigen Schwankungen um 10 % relativ konstant. Der stärkste Abfall findet sich zwischen Tag 3 und 5.

Analog verhält sich die große Fraktion, wobei die Schwankungen ihres prozentualen Anteils mit maximal 4 % deutlich geringer sind als die der mittleren Fraktion.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten steigt in beiden Ansätzen zwischen Tag 3 und 4 an und fällt zwischen Tag 4 und 5 - in S 38 deutlicher als in S 36 - wieder ab. Dieser Abfall setzt sich in S 38 weniger steil zwischen Tag 5 und 6 fort. Eine erneute Zunahme des relativen Lymphoblastenanteils findet sich dann in diesem Ansatz zwischen Tag 6 und 7.

Der prozentuale Anteil der Pyknosen steigt in S 36 zwischen Tag 3 und 4 leicht und zwischen Tag 4 und 5 steil an. Im Ansatz S 38 findet sich eine konstante starke Zunahme des relativen Pyknosenanteils zwischen Tag 3 und 6 von 13,70 % auf 92 %. Zwischen Tag 6 und 7 erfolgt ein Rückgang auf 71,30 %.

4.222 Markierungsverhalten: (s. Praktiken und Tabellen I und II S 36, S 38) Der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen im Kulturverlauf relativ konstant. Die Absolutzahl der markierten kleinen Lymphozyten fällt in beiden Ansätzen zwischen Tag 3 und 5 deutlich ab und bleibt dann bei S 28 bis zum Kulturende konstant. Die Markierungsintensität zeigt wiederum in beiden Ansätzen relative Konstanz im Kulturverlauf.

Der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten steigt im Ansatz S 36 zwischen Tag 3 und 4 an und fällt zwischen Tag 5 und 6 wieder ab. Die Absolutzahl markierter mittlerer Lymphozyten verhält sich analog. Im Ansatz S 38 dagegen fällt der Markierungsindex zwischen Tag 3 und 4 ab, um dann kontinuierlich bis zum Kulturende anzusteigen. An sich verhält sich die Absolutzahl der markierten Zellen in diesem Ansatz analog, was allerdings wegen der geringen absoluten Größe der mittleren Fraktion ab Tag 5 in Tabelle II nicht deutlich zum Ausdruck kommt. Die Markierungsintensität der mittleren Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen relativ konstant.

Der Markierungsindex der großen Fraktion verhält sich in beiden Ansätzen auf höheren Niveau analog dem der mittleren Lymphozyten. Das gilt auf niedrigerem Niveau auch für die Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten im Ansatz S 36. An sich verhält sich die Absolutzahl der markierten Zellen im Ansatz S 38 ebenfalls analog, was allerdings wegen des geringen absoluten Umfangs der großen Fraktion in Tabelle II wiederum nicht deutlich zum Ausdruck kommt. Die Markierungsintensität zeigt im Ansatz S 36 kontinuierlich hohe Werte, während im Ansatz S 38 bei an sich niedrigeren Werten ein Abfall zwischen Tag 4 und 5 zu beobachten ist und sich am Tag 7 ein deutlich über den Ergebnissen der Vortermine liegender Wert findet.

Der Markierungsindex, die Absolutzahl der markierten Lymphoblasten und ihre Markierungsintensität verhalten sich auf höheren Niveau im Ansatz S 36 analog den gleichen Parametern der großen Fraktion. Im Ansatz S 38 steigt der Markierungsindex der Immunoblasten zwischen Tag 3 und 6 zunächst langsam, dann zwischen Tag 6 und 7 steil an. Die Absolutzahl der markierten Blasten im Ansatz S 38 vermindert sich zunächst analog der Abnahme der Blastenzahl zwischen Tag 4 und 6 und steigt dann zwischen Tag 6 und 7 steil an. Die Markierungsintensität vermindert sich ebenfalls zwischen Tag 4 und 6 und zeigt am Tag 7 ein deutlich über den Vorwerten liegendes Ergebnis.

Der Markierungsindex der Pyknosen steigt im Ansatz S 36 zwischen Tag 3 und 4 an und fällt zwischen Tag 4 und 5 ebenso deutlich wieder ab. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen in diesem Ansatz steigt dagegen kontinuierlich an. Im Ansatz S 38 fällt der Pyknosenmarkierungsindex zwischen Tag 3 und 5 steil ab und bleibt dann bis zum Kulturende konstant. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen in diesem Ansatz steigt dagegen kontinuierlich an. Im Ansatz S 38 fällt der Pyknosenmarkierungsindex zwischen Tag 3 und 5 steil ab und bleibt dann bis zum Kulturende konstant. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen zeigt in diesem Ansatz einen Anstieg von Tag 3 auf Tag 4, fällt dann zum Tag 5 deutlich ab und bleibt bis zum Kulturende konstant. Die Markierungsintensität der Pyknosen bleibt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

4.223 Agglutinationseffekt: (s. Tabelle III S 36, S 38)

In beiden Ansätzen finden sich am Tag 3 hohe Agglutinationsprozentsätze, die bei geringgradigem Abfall relative Konstanz im Kulturverlauf aufweisen.

4.204 Diskussion der Zellbewegungen und des Wachstumsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 36, S 38):
Wie beim Patienten Hu.J. fanden sich am Tag 3 mehr als 85 % der Kulturzellen in Agglutinaten. Bestimmte Verdrängungen der Lymphozyten unter PHA konnten aufgrund der relativen Konstanz des einmal erreichten Agglutinatprozentatzes im Kulturverlauf weitgehend ausgeschlossen werden.

Aufgrund der gegenläufigen Zellbewegungen der kleinen Lymphozyten und Immunblasten zwischen Tag 3 und 4 konnte ein direkter Zusammenhang dieser beiden morphologischen Zelltypen im Sinne eines direkten Übergangs von kleinen Lymphozyten in Immunblasten angenommen werden. Mit 26,50 % (S 36) bzw. 24,07 % (S 38) waren die Gewinne der Blastenfraction bis zum Tag 4 für eine CLL-Population relativ groß, was gut mit den günstigen klinischen Befunden bei diesem Patienten korrelierte (s.dort).

Die im Ansatz S 36 nachgewiesene verzögerte Transformation war im Ansatz S 38 nur in Form einer Zunahme des Immunblastenprozentatzes zwischen Tag 3 und 7 von 2,0 % auf 20,02 % deutlich. So zeigte sich auch bei diesem Patienten, daß ein Teil der CLL-T-Zellen verzögert auf PHA reagierte.

Die Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten wies in den Ansätzen S 36 und S 38 keine wesentlich größere Amplitude als 10 bzw. 4 % auf. Die Größenordnung dieser Bewegung sprach auch in diesen beiden Fällen gegen eine deutlichere Beteiligung der mittleren und großen Fraktion an der Blastopoese, wobei sich die große Fraktion noch träger verhielt als die mittlere.

Das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) ließ sich anhand der Zellbewegungen nicht nachweisen,

war aber aufgrund des Markierungsverhaltens, wie noch zu zeigen sein wird, wahrscheinlich.

Wohl bedingt durch ausgesprochen ungünstige Kulturbedingungen fand sich ab Tag 4 eine massive Zellinvolution in beiden Ansätzen. Ausdruck dieses Zelluntergangs war der steile Anstieg des relativen Pyknosenanteils korrelierend mit einem deutlichen Abfall der prozentualen Anteile der kleinen, mittleren und großen Lymphozyten.

Zugrundegehende Blasten trugen zur Vermehrung der Pyknosenfraktion kaum bei, da Immunblasten in der Regel über Autolyse abstarben. Der starke Blastenabfall im Ansatz S 38 zwischen Tag 4 und 5 war dann wohl durch fehlenden Nachschub aus der kleinen Fraktion bei gleichzeitiger Autolyse durch ungünstige Kulturbedingungen verursacht.

Wie beim Patienten Hu.J. (S 28, S 30) waren der Blastenmarkierungsindex und die Absolutzahl der markierten Immunblasten am Tag 3 relativ niedrig. Im Ansatz S 36 kam es zum Tag 4 zu einem deutlichen Anstieg beider Parameter, die zwischen Tag 4 und 5 wieder abfielen. In der Kultur S 38 fand sich bis zum Tag 6 ein mäßiger, zwischen Tag 6 und 7 ein steiler Anstieg des Markierungsindex, während die Absolutzahl markierter Blasten erst zwischen Tag 6 und 7 deutlich zunahm.

Dieses Markierungsverhalten der Immunblasten korrelierte in beiden Ansätzen mit relativer Konstanz des Markierungsindex der kleinen Lymphozyten zwischen Tag 3 und dem Kulturende bei kontinuierlicher Abnahme der Absolutzahl markierter kleiner Zellen.

Am Tag 3 und am Tag 4 setzten sich demnach wahrscheinlich markierte und nicht markierte kleine Lymphozyten relativ unselektioniert zu Blasten um. Dies zeigte sich besonders deutlich in S 38, wo zu beiden Terminen der Blastenmarkierungsindex und der der kleinen Fraktion nahezu identisch waren.

Zu späten Terminen kamen dagegen in stärkerem Ausmaß markierte kleine Lymphozyten zur Transformation. Die Konstanz des Markierungsindex der kleinen Fraktion erklärte sich durch gleichzeitige Verluste nicht markierter kleiner Lymphozyten an die Pyknosenfraktion.

Es fanden sich also beim Patienten R.A. zwei Blastenfraktionen. Die erste, am 3. und 4. Tag auftretende entsprach dem Ergebnis der PHA-abhängigen Transformation im Sinne der CLL nicht oder nur gering vorgeschädigter kleiner Lymphozyten, während die zweite wohl als Transformationsergebnis kleiner, in ihrer PHA-Ansprechbarkeit eingeschränkter T-Zellen, die zu späten Terminen verzögert zum Umsatz kamen, zu werten war. Viele dieser Zellen waren markiert, was wie beim Patienten Hu.J. wahrscheinlich als Ausdruck günstiger Stoffwechselverhältnisse und damit trotz eingeschränkter PHA-Ansprechbarkeit guter Transformationsvoraussetzungen anzusehen war.

Die zu frühen Kulturzeitpunkten auftretenden hochmarkierten blastoiden Zellen konnten wegen fehlender Ansätze zu diesen Terminen nicht nachgewiesen werden.

Das Markierungsverhalten der großen Lymphozyten zeigte bezüglich aller Parameter in beiden Ansätzen weitgehende Übereinstimmung mit dem der Blasten. Bei der Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten war diese Analogie in

S 38 zu späten Terminen aufgrund des geringen Umfangs der großen Fraktion nur undeutlich ausgeprägt (s. Tabelle II S 38).

Markierungsindex und Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten zeigten in beiden Ansätzen analoges Verhalten mit den gleichen Parametern der großen Fraktion.

Bei Berücksichtigung der in den Zellbewegungen deutlichen geringen Eigendynamik beider Fraktionen sprach dieses Markierungsverhalten dafür, daß ein geringer Prozentsatz zu Blasten sich umsetzender kleiner Lymphozyten in Form von "transitional cells" (61, 175) im morphologischen Erscheinungsbild dieser beiden Zellcompartimente aufschien.

Der Pyknosenmarkierungsindex fiel bei S 36 zwischen Tag 4, bei S 38 zwischen Tag 3 und dem Kulturende kontinuierlich ab. Gleichzeitig stieg der relative Pyknosenanteil steil an. Dies war wahrscheinlich durch generalisierten Zelluntergang zum Kulturende hin bedingt, wobei markierte Zellen in geringerem Ausmaß betroffen waren als nicht markierte. Der deutliche Anstieg markierter Pyknosen bei S 36 zwischen Tag 4 und 5, bei S 38 zwischen Tag 3 und 4 (s. Tabellen II) ließ sich durch den Zusammenfall stärkerer Blastopoese und schlechter Kulturbedingungen - Ausdruck war der schon zu frühen Terminen steile Anstieg des relativen Pyknosenanteils - erklären. Denn wie der stets höher als der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten liegende Blastenmarkierungsindex zeigte, war einerseits der Anteil markierter Zellen im transformierenden T-Lymphozytencompartiment immer etwas größer als im ruhenden, andererseits waren sich umsetzende aktive Zellen gegen Störungen empfindlicher als ruhende.

Pat.R.A. S36 PHA CLL.

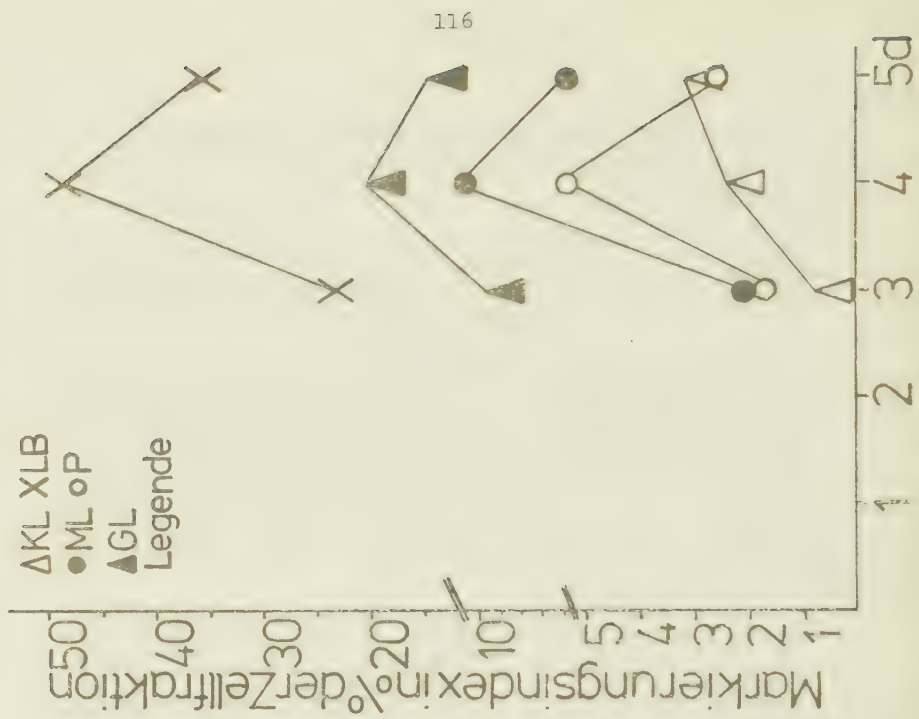
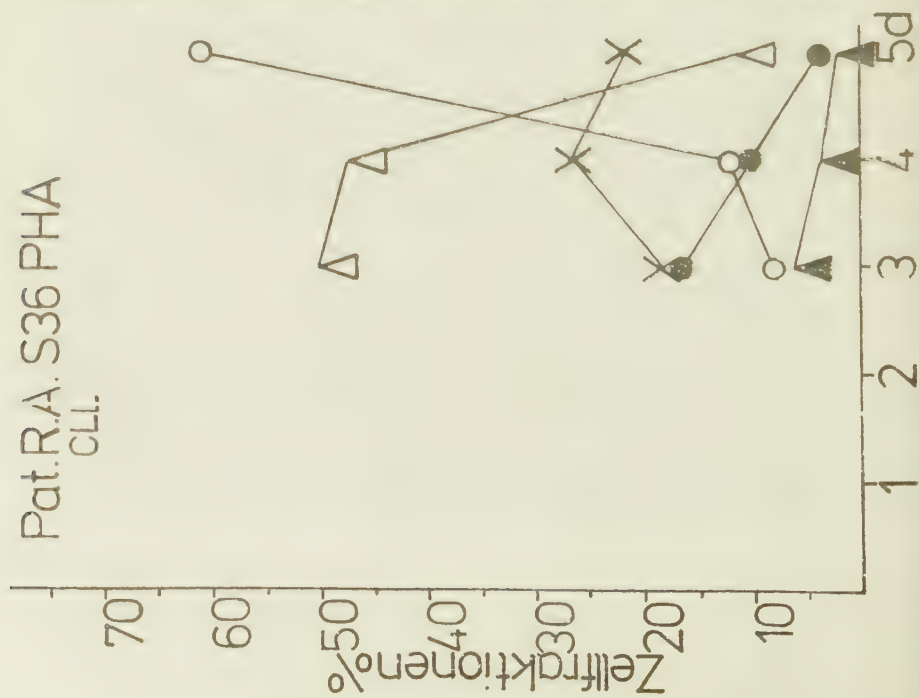


Tabelle I Pat. R.A. S 36 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	14	17	20
ML=mittlere Lymphozyten	18	18	16
GL=große Lymphozyten	92	96	141
LB=Lympho- blasten	122	158	170
P=Pyknosen	11	13	11

Tabelle II Pat. R.A. S 36 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	14	11	3
ML=mittlere Lymphozyten	5	12	2
GL=große Lymphozyten	6	7	2
LB=Lympho- blasten	43	130	79
P=Pyknosen	1	7	17

Tabelle III Pat. R.A. S 36 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	3	4	5
Freie Zellen	5,06	3,55	6,60
Zellen in Agglutinat	94,94	96,45	93,40

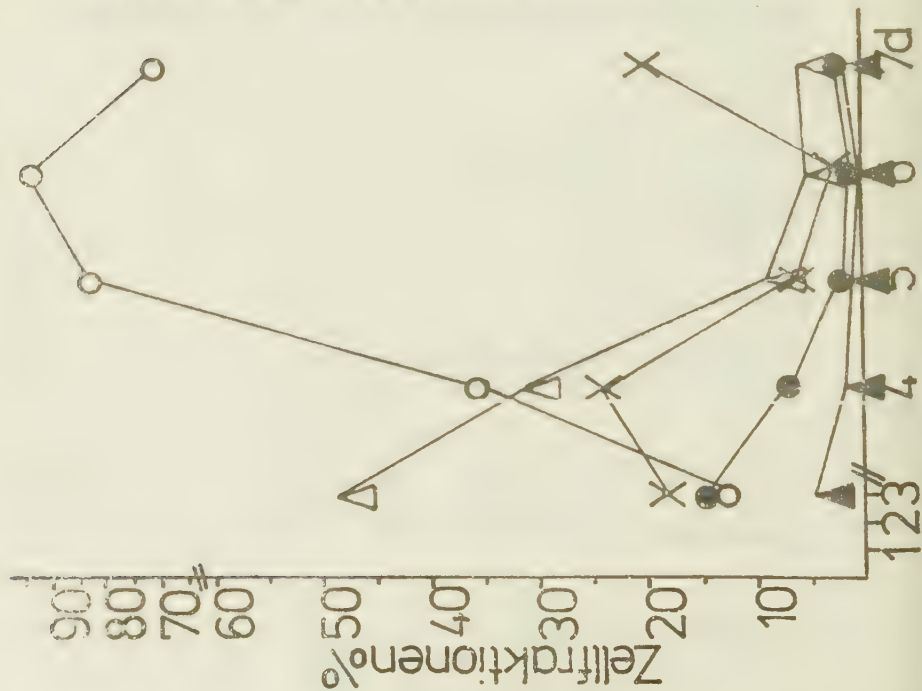
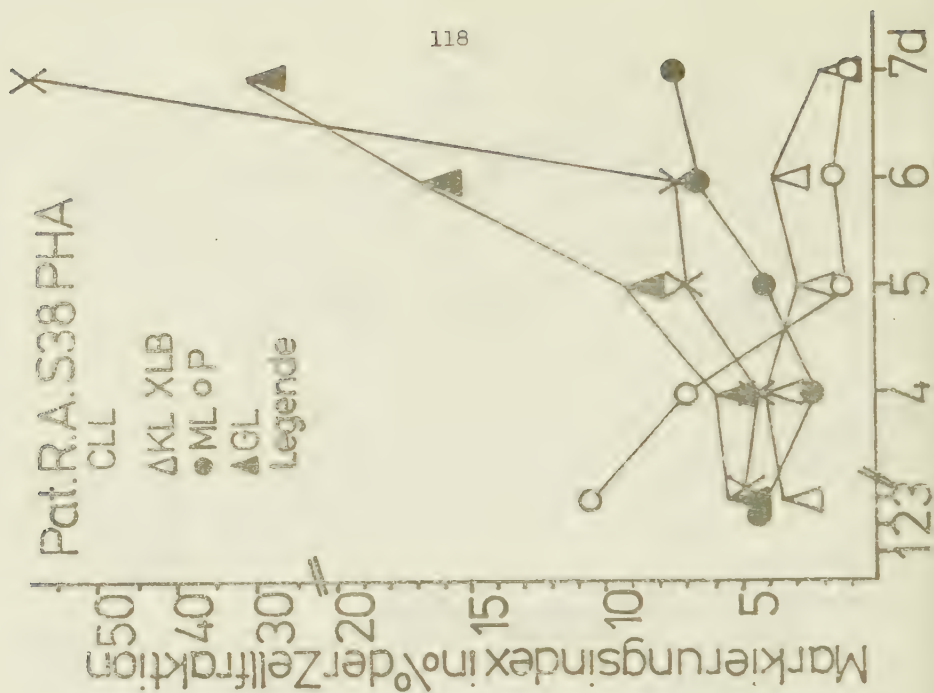


Tabelle I Pat. R.A. S 38 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	3	4	5	6	7
KL=kleine Lymphozyten	19	20	14	12	11
ML=mittlere Lymphozyten	26	25	18	18	17
GL=große Lymphozyten	30	40	16	17	121
LB=Lympho- blasten	49	43	27	28	122
P=Pyknosen	12	14	11	11	12

Tabelle II Pat. R.A. S 38 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	3	4	5	6	7
KL=kleine Lymphozyten	16	13	2	2	1
ML=mittlere Lymphozyten	6	2	1	1	2
GL=große Lymphozyten	2	1	1	1	5
LB=Lympho- blasten	9	10	5	2	120
P=Pyknosen	15	26	10	13	10

Tabelle III Pat. R.A. S 38 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	3	4	5	6	7
Freie Zellen	1,93	1,10	2,63	4,90	8,28
Zellen in Agglutinaten	98,07	98,90	97,37	95,10	91,72

4.23 Patient Hög.J.:

4.231 Zellbewegungen: (s. Graphiken S 42, S 43, S 44)

Es findet sich zu frühen Kulturterminen eine relative Konstanz des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl. Bei S 42 und S 43 kommt es zwischen Tag 3 und 5, bei S 44 zwischen Tag 3 und 4 zu einem steilen Abfall des relativen Anteils der kleinen Lymphozyten.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten an der Gesamtzellzahl hält sich im Kulturverlauf bei S 42 und S 43 bis zum Tag 4, bei S 44 bis zum Tag 3 bei geringfügigen Schwankungen um 10 % relativ konstant. Bei S 42 und S 43 kommt es zwischen Tag 4 und 5 zu einem steilen Abfall des relativen Anteils der mittleren Lymphozyten.

Analoges Verhalten zeigt die Fraktion der großen Lymphozyten, wobei die Schwankungen ihres prozentualen Anteils mit 5 % noch geringer sind als die der mittleren Fraktion.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten fällt bei S 42 und S 43 zwischen Tag 2 und 3, bei S 44 zwischen Tag 0 und 2 ab, um bei den ersten beiden Ansätzen zwischen Tag 3 und 4, bei S 44 zwischen Tag 2 und 4 wieder anzusteigen. Bei S 42 und S 43 kommt es zu einem Wiederabfall des relativen Immunoblastenanteils zwischen Tag 4 und 5.

Der relative Anteil der Pyknosen steigt nach weitgehender Konstanz zu frühen Kulturterminen bei S 42 und S 43 zwischen Tag 3, bei S 44 zwischen Tag 2 und dem Kulturende steil an.

4.262 Markierungsverhalten: (s. Graphiken und Tabellen I und II S 42, S 43, S 44) Der Markierungsindex und die Markierungsintensität der kleinen Lymphozyten halten sich in allen Ansätzen relativ konstant. Die Absolutzahl der markierten kleinen Lymphozyten fällt in allen Ansätzen im Kulturverlauf deutlich ab.

Der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten fällt im Ansatz S 42 zwischen Tag 2 und 4 ab, um zwischen Tag 4 und 5 wieder anzusteigen. Im Ansatz S 43 findet sich ein unbedeutender Anstieg zwischen Tag 2 und 3 und dann ein Abfall bis zum Kulturende. In S 44 fällt der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten zwischen Tag 0 und 3 deutlich ab. Die Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten zeigt in allen Ansätzen einen mehr oder weniger deutlich ausgeprägten Abfall im Kulturverlauf, während die Markierungsintensität sich relativ konstant hält.

Alle Parameter des Markierungsverhaltens der großen Lymphozyten und der Lymphoblasten zeigen in den vorliegenden drei Ansätzen auf höherem Niveau analoges Verhalten zu denen der mittleren Fraktion.

Der Pyknosenmarkierungsindex fällt im Ansatz S 42 zwischen Tag 2 und 5 ab, im Ansatz S 43 zeigt er einen steilen Anstieg zwischen Tag 2 und 3 und fällt dann zum Kulturende ab, im Ansatz S 44 steigt er zwischen Tag 0 und 2, um zum Tag 3 wieder abzufallen. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen steigt in allen drei Ansätzen im Kulturverlauf an. Die Markierungsintensität hält sich konstant.

4.233 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III S 42, S 43, S 44) Der Prozentsatz der in Agglutinaten liegenden Zellen erreicht in allen drei Ansätzen Normallymphozyten vergleichbare Werte und zeigt bei geringfügigen Schwankungen relative Konstanz im Kulturverlauf.

4.234 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 42, S 43, S 44): Wie in den Ansätzen der Patienten Hu.J. und R.A. fanden sich ab Tag 2 mehr als 85 % der Kulturzellen in Agglutinaten. Gestörte Vitalbedingungen der Lymphozyten unter PHA-Wirkung waren aufgrund der relativen Konstanz des einmal erreichten Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf unwahrscheinlich.

Abweichend zu den Ansätzen des Patienten Hu.J. fand sich in S 44 bereits am Tage 0 ein Normallymphozyten vergleichbarer Agglutinatprozentsatz von 93,70 %. Der weitere konstante Anstieg zwischen Tag 0 und 3 zeigte jedoch auch in diesem Ansatz, daß CLL-Lymphozyten leicht verzögert auf PHA reagierten.

Da die stärkste Blastenvermehrung stets mit einer deutlichen Verminderung des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten korrelierte, war auch bei diesen Ansätzen ein direkter Zusammenhang der beiden Zellfraktionen im Sinne eines Übergangs von kleinen Lymphozyten in Immunoblasten wahrscheinlich. Mit 8,68 % (S 42) und 8,97 % (S 43) am Tag 4 sowie 7,89 % (S 44) am Tag 3 waren die Gewinne der Blastenfraktion im Kulturverlauf gering. Dies korrelierte gut mit einer relativ starken peripheren Lymphozytose bei diesem Patienten im Ansatzzeitraum (s.2.521).

Der Abfall des prozentualen Anteils der Immunblasten zwischen Tag 0 und 2 bei S 44, zwischen Tag 2 und 3 bei S 42 und besonders deutlich ausgeprägt bei S 43 erklärte sich wohl durch starken Zelluntergang von sogenannten "Frühblasten". Der prozentuale Anteil dieser hochmarkierten blastoiden Zellen an der Gesamtzellzahl überstieg nie 10 %.

Die CLL-typische verzögerte Blastentransformation zu späten Kulturterminen konnte wegen fehlender Ansätze nicht nachgewiesen werden.

Die Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten war auch beim Patienten Hög.J. so gering, daß eine größere Beteiligung dieser beiden Zellfraktionen an der Blastopoese ausgeschlossen werden konnte.

Das Auftreten von zu Blasten transformierenden kleinen T-Zellen als "transitional cells" (61, 175) in beiden Zellfraktionen war aufgrund des relativ blastenanalogen Bewegungsverhaltens der mittleren und großen Lymphozyten ziemlich sicher. Besonders deutlich zeigte sich diese Tatsache im Ansatz S 42, wo bei Verminderung der kleinen, mittleren und großen Fraktion sowie steilem Anstieg des prozentualen Anteils der Pyknosen zwischen Tag 4 und 5 der Umfang der Immunblastenfraktion relativ konstant blieb. In Korrelation mit der allgemeinen Zellinvoluktion wäre ein Abfall des Immunblastenanteils zu erwarten gewesen. Die relative Konstanz war wohl durch den Übergang bereits antransformierter "transitional cells" (61, 175) aus der mittleren und großen Fraktion in die Immunblastenfraktion zu erklären, zumal da in keinem Ansatz der gesamten Untersuchungsreihe eine meßbare Transformation kleiner Lymphozyten am Tag 5 nachzuweisen war.

Der prozentuale Anteil der Pyknosen stieg in allen Ansätzen zwischen Tag 2 und dem Kulturende deutlich an. Zu frühen Terminen (s.S 44) war er relativ konstant.

In den Ansätzen S 42 und S 43 korrelierte dieser Anstieg zwischen Tag 3 und 4, in S 44 zwischen Tag 2 und 3 lediglich mit einem deutlichen Abfall des prozentualen Anteils der kleinen Fraktion. Dies sprach für ungünstige Transformationsverhältnisse kleiner T-Zellen, die über Involution zugrunde gingen. Dafür waren wahrscheinlich zwei Faktoren verantwortlich: einmal eine reduzierte Ansprechbarkeit der T-Zellen auf PHA - diese war beim Patienten Hög.J. aufgrund der größeren Malignität des B-zell-leukämischen Prozesses, die sich auch in einer starken peripheren Lymphozytose (29 900 - 37 000 Leukozyten, davon 98 % Lymphozyten) ausdrückte, sicher stärker ausgeprägt als bei den Patienten Hu.J. und R.A. -; zweitens die aus stereometrischen Gründen bei großer B-Zellpopulation eingeschränkten Funktionsmöglichkeiten des von antigen-stimulierten T-Zellen abgesonderten mitoseinduzierenden Faktors MIF.

Die weitere starke Zunahme des prozentualen Pyknosenanteils zwischen Tag 4 und 5 bei gleichzeitiger Verminderung aller übrigen Zellfraktionen in S 42 und S 43 sprach dagegen für generalisierten Zelluntergang bei sich verschlechternden Kulturbedingungen.

Während der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten von geringfügigen Schwankungen abgesehen im gesamten Kulturverlauf konstant blieb, fiel die Absolutzahl markierter kleiner Zellen deutlich ab, besonders ausgeprägt zwischen Kulturbeginn und Tag 4. Markierungsindex und Absolutzahl

markierter Blasten fielen im selben Zeitraum deutlich ab. Lediglich im Ansatz S 43 kam es zwischen Tag 2 und 3 zu einem Wiederanstieg des Markierungsindex der Blastenfraktion.

Dieser Wiederanstieg des Blastenmarkierungsindex zwischen Tag 2 und 3 im Ansatz S 43 bei Konstanz der Absolutzahl der markierten Immunoblasten erklärte sich in Korrelation mit dem im selben Ansatz zu diesem Termin zu beobachtenden Abfall des relativen Immunoblastenanteils durch starke Autolyse im Compartment der "Frühblasten", wobei markierte Zellen wahrscheinlich wegen besserer Stoffwechselbedingungen weniger stark betroffen waren als nicht markierte.

Entsprechend den Vorbefunden fanden sich also auch beim Patienten Hög.J. zwei unterschiedliche Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen nachweisbare entsprach möglicherweise dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher aber handelte es sich bei diesen Zellen wie ausgeführt nicht um echte Blasten, sondern um eine Population bereits zirkulierender hochmarkierter blastoider Zellelemente. Diese sogenannten "Frühblasten" machten zu frühen Kulturzeitpunkten ca. 10 % der Gesamtzellzahl aus. Die zweite, am 3. bzw. 4. Tag auftretende Immunoblastenfraktion war als Ergebnis PHA-abhängiger Transformation kleiner Lymphozyten zu werten.

Die bei den Patienten Hu.J. und R.A. zu beobachtende dritte Blastenfraktion als Ergebnis der CLL-typischen verzögerten Transformation zu späten Terminen war beim Patienten Hög.J. aufgrund fehlender Ansätze nicht nachweisbar.

Das Markierungsverhalten der großen und mittleren Lymphozyten wies in allen drei Ansätzen weitgehende Analogie zu dem der Immunblasten auf. Bei der geringen Eigendynamik beider Fraktionen sprach dieses Markierungsverhalten dafür, daß ein gewisser Prozentsatz zu Blasten sich umsetzender kleiner T-Zellen in Form von "transitional cells" (61, 175) im morphologischen Gewand dieser beiden Fraktionen erschien.

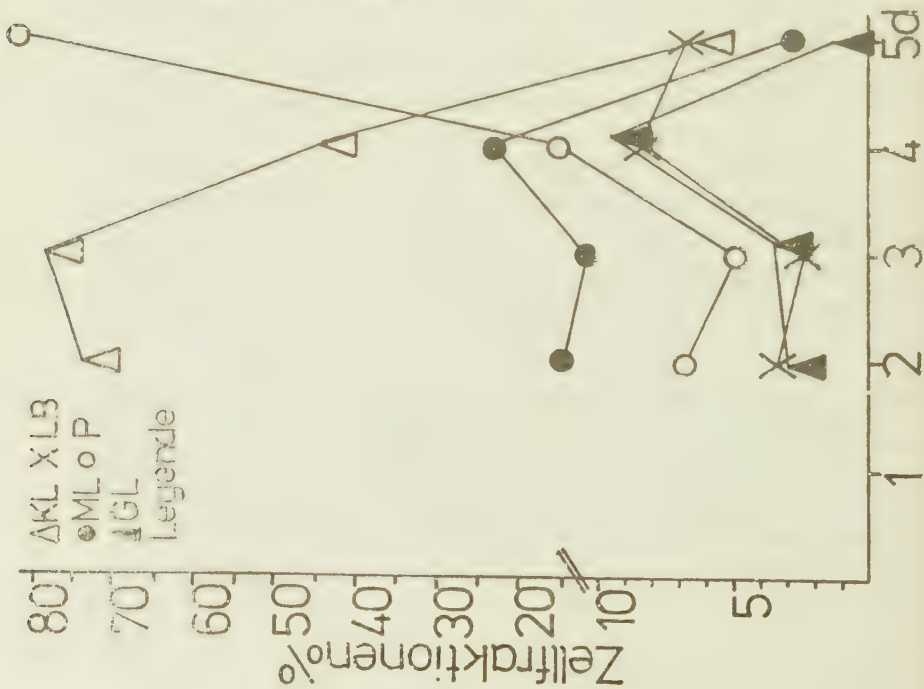
Der Markierungsindex der Pyknosen zeigte im Ansatz S 42 einen konstanten Abfall zwischen Tag 2 und 5. Gleichzeitig war die Absolutzahl der markierten Pyknosen bis zum Tag 4 relativ konstant, um zum Tag 5 stärker anzusteigen. Da unseren Beobachtungen gemäß bis zum Tag 4 die große Mehrzahl der Pyknosen aus der Blastopoese stammte, korrelierte dieses Markierungsverhalten gut mit der Zusammensetzung der bis zum Tag 4 zu Blasten transformierenden T-Zellcompartimente.

Da markierte Zellen früher zum Umsatz kamen als nicht markierte, entsprach der zunächst relativ hohe Pyknosenmarkierungsindex den Erwartungen. Der Abfall zum Tag 3 - 4 erklärte sich aus der zunehmenden Beteiligung nicht markierter Zellen an der Transformation. Der weitere Abfall zwischen Tag 4 und 5 bei gleichzeitigem Anstieg der Absolutzahl markierter Pyknosen war durch generalisierten Zelluntergang bedingt, der wie ausgeführt nicht markierte Zellen in stärkerem Maße als markierte betraf.

Analog war wohl das Pyknosenmarkierungsverhalten im Ansatz S 44 zu deuten. Abweichend fand sich im Ansatz S 43 zwischen Tag 2 und 3 ein Anstieg des Markierungsindex und der Absolutzahl der markierten Pyknosen. Gleichzeitig fand sich eine Verringerung des relativen Pyknosenanteils.

Dies deutete auf eine Störung der PHA-abhängigen Blastopoese hin. Markierte Zellen waren von dieser Störung offensichtlich weniger betroffen als nicht markierte. Die Pyknosenfraktion war im Fließgleichgewicht der Kulturen als in Richtung Zelluntergang offenes System zu werten, d.h. die pyknotische Zelle war lediglich ein morphologisches Durchgangsstadium vor dem endgültigen Zellzerfall. Auf der Basis der oben erwähnten Störung kam es dann wohl, da markierte Zellen langsamer involuтиerten als nicht markierte, zu einer Akkumulation markierter Pyknosen, was bei absoluter Verminderung des Pyknosenanteils zu einem Anstieg des relativen Wertes Markierungsindex führen mußte.

Δ KL XLB
● ML o P
x GL
Legende



Pat.Hög.J. S42PHA
CLL

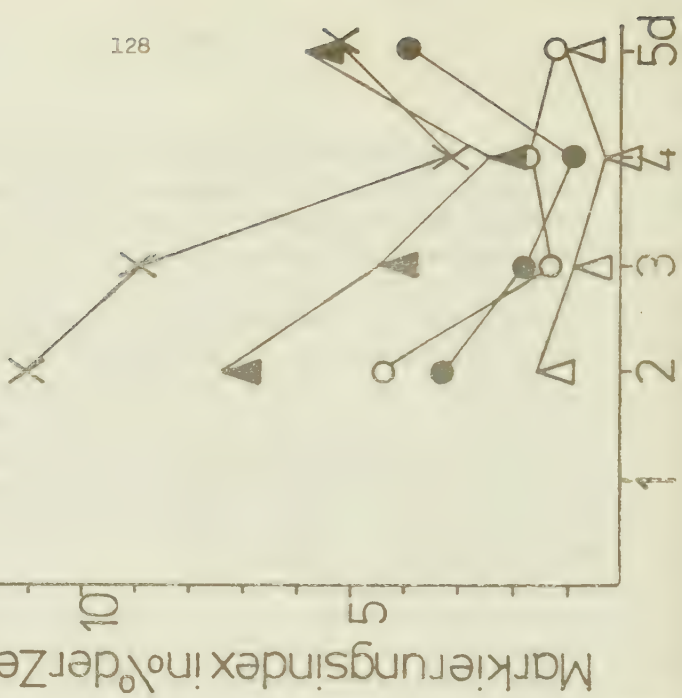


Tabelle I Pat. Hög.J. S 42 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	20	17	14	15
ML=mittlere Lymphozyten	25	18	26	14
GL=große Lymphozyten	19	18	30	17
LB=Lympho- blasten	25	24	32	22
P=Pyknosen	8	7	12	9

Tabelle II Pat. Hög.J. S 42 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	11	6	1	1
ML=mittlere Lymphozyten	4	2	2	1
GL=große Lymphozyten	2	1	2	1
LB=Lympho- blasten	4	3	3	3
P=Pyknosen	3	1	3	10

Tabelle III Pat. Hög.J. S 42 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	2	3	4	5
Freie Zellen	4,85	3,07	4,76	4,99
Zellen in Agglutinaten	95,15	96,93	95,24	95,01

Pat.Hög.J.S43PHA

ΔKL XLB

●MLoP

▲AGL

Legende

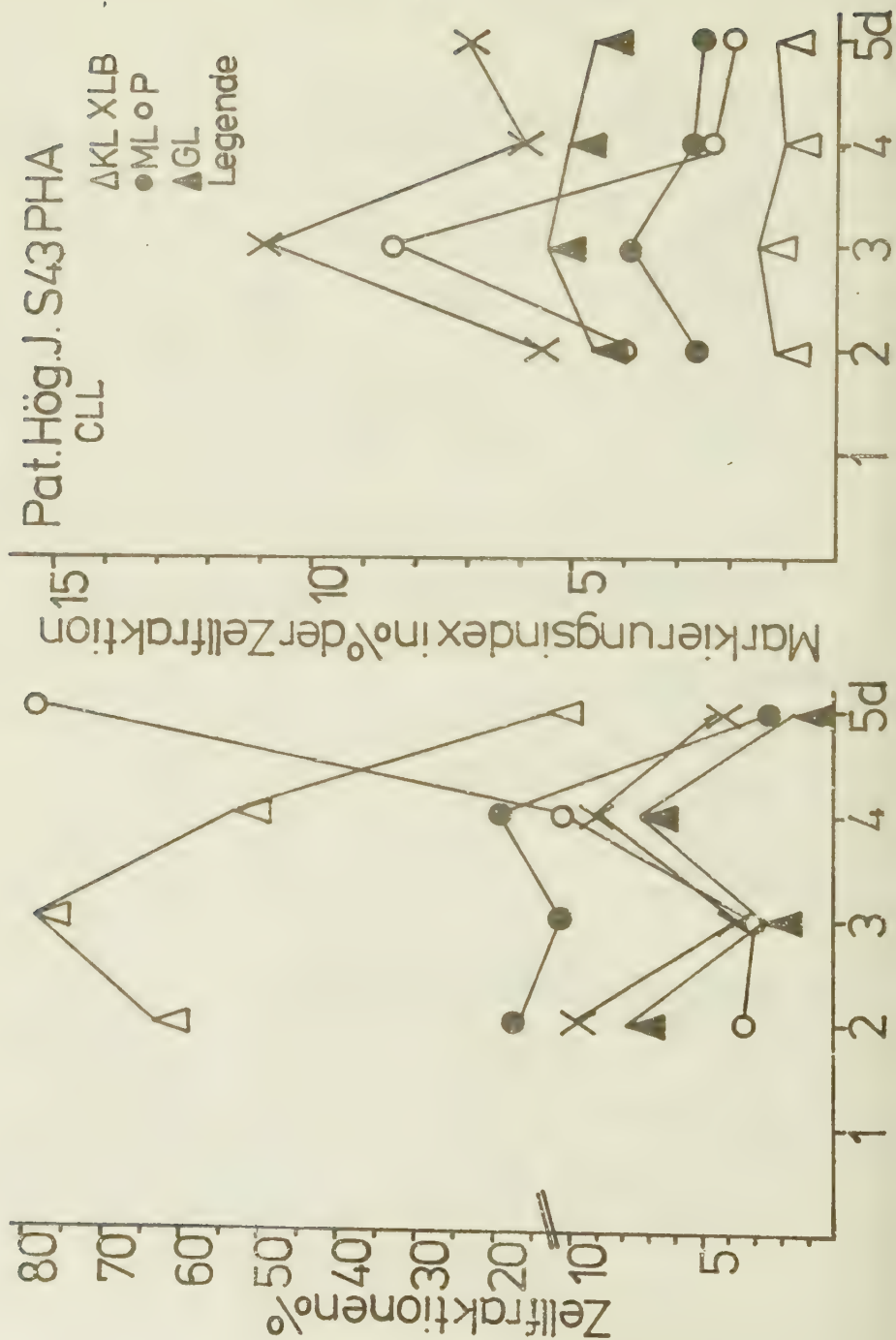


Tabelle I Pat. Hög.J. S 45 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	25	19	17	15
ML=mittlere Lymphozyten	23	24	21	17
GL=große Lymphozyten	29	32	23	20
LB=Lympho- blasten	31	30	32	20
P=Pyknosen	14	9	8	9

Tabelle II Pat. Hög.J. S 43 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	7	11	5	1
ML=mittlere Lymphozyten	5	4	5	1
GL=große Lymphozyten	3	1	4	1
LB=Lympho- blasten	5	5	5	3
P=Pyknosen	1	3	3	16

Tabelle III Pat. Hög.J. S 43 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	2	3	4	5
Freie Zellen	2,27	7,72	4,86	9,34
Zellen in Agglutinaten	97,73	92,28	95,14	90,66

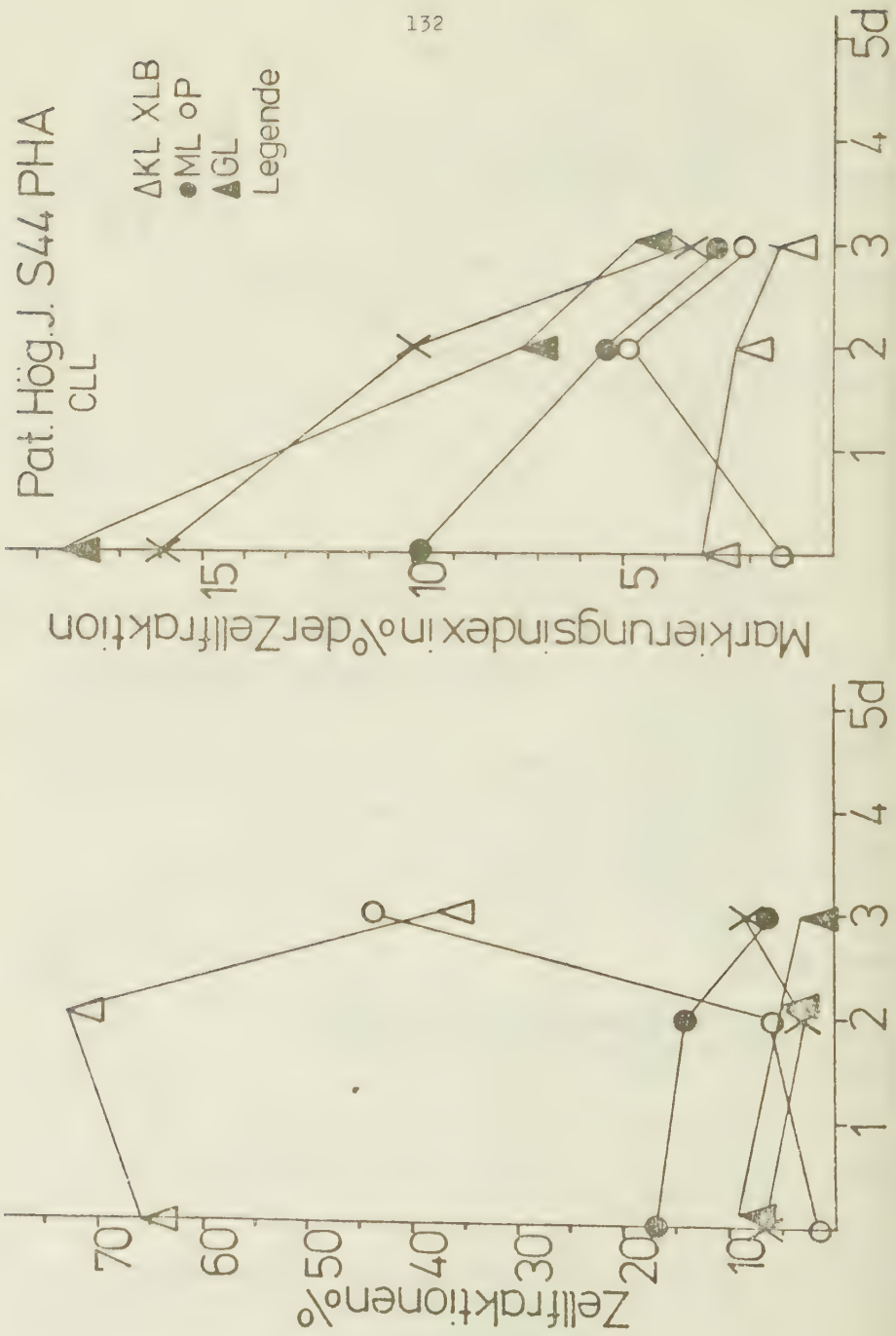


Tabelle I Pat. Hög.J. S 44 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	2	3
KL=kleine Lymphozyten	18	17	15
ML=mittlere Lymphozyten	23	19	20
GL=große Lymphozyten	31	19	25
LB=Lympho- blasten	33	22	30
P=Pyknosen	9	8	10

Tabelle II Pat. Hög.J. S 44 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	2	3
KL=kleine Lymphozyten	20	16	4
ML=mittlere Lymphozyten	17	8	2
GL=große Lymphozyten	16	3	1
LB=Lympho- blasten	11	3	3
P=Pyknosen	1	3	10

Tabelle III Pat. Hög.J. S 44 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	2	3
Freie Zellen	6,30	3,36	2,54
Zellen in Agglutinat	93,70	96,64	97,46

4.24 Patient S.W.:

4.241 Zellbewegungen: (s.Graphiken S 47, S 48, S 51)

In den Ansätzen S 47 und S 48 findet sich ein Anstieg des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten zwischen Tag 0 und 2, der mit einem nahezu spiegelbildlichen Abfall der mittleren Lymphozyten korreliert. Ab Tag 2 findet sich in allen drei Ansätzen ein kontinuierlicher Abfall des relativen Anteils der kleinen Lymphozyten im Kulturverlauf.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten an der Gesamtzellzahl hält sich von den beschriebenen Ausnahmen abgesehen bei geringfügigen Schwankungen knapp über 10 % in allen drei Ansätzen im gesamten Kulturverlauf relativ konstant.

Analoges Verhalten zeigt die Fraktion der großen Lymphozyten, wobei die Schwankungen ihres prozentualen Anteils zwischen 5 und 10 % liegen und damit noch geringer sind als die der mittleren Fraktion.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten steigt in S 47 zwischen Tag 0 und 5, in S 48 zwischen Tag 0 und 4 und in S 51 zwischen Tag 2 und 4 kontinuierlich an. In S 47 fällt er dann zwischen Tag 5 und 7, in S 48 zwischen Tag 4 und 5 wieder ab.

Der relative Lyknosenanteil steigt in allen drei Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Kulturende konstant an.

4.242 Markierungsverhalten: (s.Graphiken und Tabellen I und II S 47, S 48, S 51) Markierungsindex und Markierungsintensität der kleinen Lymphozyten halten sich im gesamten

Kulturverlauf in allen drei Ansätzen relativ konstant. Die Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten dagegen vermindert sich kontinuierlich zwischen Kulturbeginn und Kulturende.

Der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten fällt in den Ansätzen S 47 und S 48 zwischen Tag 0 und 2 ab, steigt dann zwischen Tag 2 und 4 wieder an, um zum Kulturende erneut abzufallen. Im Ansatz S 51 zeigt der Markierungsindex einen kontinuierlichen Abfall zwischen Tag 2 und 4. Die Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten fällt in allen drei Ansätzen im Kulturverlauf ab. Die Markierungsintensität dagegen hält sich weitgehend konstant. Im Ansatz S 47 findet sich am Tag 0 ein deutlich über den anderen Werten liegender mean-grain-count.

Im Ansatz S 47 fällt der Markierungsindex der großen Lymphozyten zwischen Tag 0 und 2 deutlich ab, steigt zwischen Tag 2 und 3 wieder an, fällt zum Tag 4 erneut ab und steigt dann zum Kulturende wieder an. Die Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten verhält sich bis zum Tag 5 analog, fällt dann allerdings zum Kulturende ab. Im Ansatz S 48 fällt der Markierungsindex zwischen Tag 0 und 2 ebenfalls deutlich ab, um zwischen Tag 2 und dem Kulturende am Tag 5 kontinuierlich anzusteigen. Die Absolutzahl der markierten Lymphozyten fällt in diesem Ansatz zwischen Tag 0 und 5 konstant ab. Im Ansatz S 51 steigt der Markierungsindex zwischen Tag 2 und 3 und fällt zwischen Tag 3 und 4. Die Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten vermindert sich kontinuierlich zwischen Tag 2 und 4. Die Markierungsintensität der großen Lymphozyten hält sich in allen drei Ansätzen im Kulturverlauf weitgehend konstant.

Der Markierungsindex der Lymphoblasten fällt im Ansatz S 47 zwischen Tag 0 und 7 konstant ab. Die Absolutzahl der markierten Lymphoblasten fällt zwischen Tag 0 und 2 deutlich ab, steigt zum Tag 3 wieder an, fällt zum Tag 4 erneut ab, um zum Tag 5 wieder anzusteigen und dann zum Kulturende deutlich abzufallen. In S 48 fällt der Markierungsindex der Blastenfraktion zwischen Tag 0 und 2 gleichfalls ab, steigt zum Tag 3 wieder an, fällt zwischen Tag 3 und 4 wieder ab und steigt zum Tag 5 erneut. Die Absolutzahl der markierten Immunoblasten verhält sich analog bis zum Tag 4, um dann zwischen Tag 4 und 5 weiter abzufallen. Im Ansatz S 51 verhalten sich beide Parameter zwischen Tag 2 und 4 wie bei S 48. Die Blastenmarkierungsintensität hält sich in S 47 und S 48 im Kulturverlauf relativ konstant, in S 51 fällt sie zwischen Tag 2 und 3 deutlich ab, und bleibt dann zum Tag 4 unverändert.

Der Markierungsindex der Pyknosen fällt in allen drei Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Kulturende konstant ab, die Absolutzahl der markierten Pyknosen dagegen steigt an. Die Markierungsintensität der Pyknosen hält sich im Kulturverlauf konstant.

4.243 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III S 47, S 48, S 51) In S 47 und S 48 findet sich erst am Tag 2, in S 51 erst am Tag 4 ein Normallymphozyten vergleichbarer Agglutinatprozentsatz. Dieser bleibt dann im weiteren Kulturverlauf bei kontinuierlichem geringem Abfall relativ konstant.

4.244 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 47, S 48, S 51): Die verhältnismäßig langsame Entstehung von Zellagglutinat in allen Ansätzen wies auf ein verzögertes Ansprechen der CLL-Lymphozyten auf PHA hin. Gestörte Vitalbedingungen der Lymphozyten unter PHA-Wirkung waren aufgrund der relativen Konstanz des Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf unwahrscheinlich.

Der hohe prozentuale Anteil mittlerer Lymphozyten bei relativ geringem prozentuaalem Anteil der kleinen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl im Ansatz S 48 am Tage 0 war ziemlich sicher auf einen Auswertungsartefakt zurückzuführen. Infolge großer Projektion wurden wohl zahlreiche kleine Zellen zur mittleren Fraktion gezählt. Das gleiche galt für den Ansatz S 47.

Der zeitliche Zusammenfall kontinuierlicher Blastenzunahme mit kontinuierlichem Abfall des prozentualen Anteils kleiner Lymphozyten in allen drei Ansätzen legte auch im Falle dieses Patienten einen direkten Zusammenhang der beiden morphologischen Zelltypen im Sinne eines Übergangs von kleinen Lymphozyten in Immunoblasten nahe.

Korrelierend mit einer starken peripheren Lymphozytose (41 000 - 46 000, davon 93 % Lymphozyten) im Ansatzzeitraum waren es in S 47 und S 48 die Gewinne der Immunoblastenfraktion mit 21,0 % bis zum Tag 5 (S 47) bzw. mit 12,32 % bis zum Tag 4 (S 48) relativ gering. Im Ansatz S 51 fanden sich dagegen bei einer peripheren Leukozytose von nur 3 000 Zellen (davon 73 % Lymphozyten) mit immerhin 37,28 % Immunoblasten am Tag 4 nahezu mit Normalkulturen vergleichbare Blastenzahlen.

Im Ansatz S 47 ließ sich anhand der Zellbewegungen der Immunoblastenfraktion zwischen Tag 4 und 7 die CLL-typische verzögerte Transformation erkennen. Der relative Immunoblastenanteil erreichte am Tag 5 mit 21 % den höchsten Wert. Mit 10,05 % der Gesamtzellzahl war die Immunoblastenfraktion aber auch am Tag 7 noch relativ groß und nach der Pyknosenfraktion das zweitgrößte Zellcompartiment zu diesem späten Kulturtermin.

Die Bewegungen der mittleren und großen Lymphozyten waren auch beim Patienten S.W. so unbedeutend, daß eine größere Beteiligung beider Zellfraktionen an der Blastopoese nicht anzunehmen war. So waren wohl die gegenläufigen Bewegungen zwischen kleiner, mittlerer und großer Fraktion als Ausdruck von Zellübergängen zwischen diesen Fraktionen durch das Auftreten eines geringen Prozentsatzes zu Blasten transformierender kleiner T-Zellen im morphologischen Gewand dieser Compartimente bedingt.

Der konstante steile Anstieg des relativen Pyknosenanteils in allen drei Ansätzen im Kulturverlauf war zu frühen Terminen wahrscheinlich durch infolge der Malignität des Prozesses schlechte T-Zellqualität und große B-Zellpopulation - damit unzureichende Wirksamkeit des MIF - bedingt. Unzureichend stimulierte Zellen gingen durch Involution zugrunde. Dazu kam zu späten Kulturterminen noch der Zelluntergang durch sich verschlechternde Kulturbedingungen.

Während der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten im gesamten Kulturverlauf konstant blieb, fiel die Absolutzahl markierter kleiner Zellen deutlich ab. Der Immunoblastenmarkierungsindex fiel in S 47 im Kulturverlauf

zwischen Tag 0 und 7 von hohem Niveau konstant ab. In S 48 kam es nach steilem Abfall des Markierungsindex zwischen Tag 0 und 2 zu einem Wiederanstieg zum Tag 3, zu einem Abfall zum Tag 4 und einem erneuten Anstieg zum Tag 5. Zwischen Tag 2 und 4 verhielt sich der Blastenmarkierungsindex in S 51 analog. Die Absolutzahl der Immunoblasten folgte im wesentlichen dem Verhalten des Markierungsindex:

Dieses Markierungsverhalten zeigte, daß markierte kleine T-Zellen früher zur Transformation kamen als nicht markierte. Im Ansatz S 47 war der Anteil markierter kleiner Lymphozyten im gesamten Kulturverlauf groß. Im Ansatz S 48 nahm er zwischen Tag 2 und 5 deutlich zu.

Entsprechend den Vorbefunden fanden sich also auch beim Patienten S.W. drei unterschiedliche Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Kulturterminen auftretende entsprach wohl wie beschrieben einer Fraktion bereits zirkulierender hochmarkierter Zellen von Blastengröße und machte zu Kulturbeginn ca. 10 % der Gesamtzellzahl aus. Die zweite, am Tag 4 besonders deutlich in S 51 auftretende war als Ergebnis PHA-abhängiger Transformation kleiner, im Sinne der Grundkrankheit wenig veränderter Lymphozyten zu werten. Die dritte entsprach der Transformation von in ihrer PHA-Ansprechbarkeit eingeschränkten CLL-T-Zellen, die zu späten Terminen zum Umsatz kamen. Ein hoher Prozentsatz dieser Zellen war markiert. Im Ansatz S 47 und im Ansatz S 48 waren die Blastenfraktionen zwei und drei aufgrund eines hohen Prozentsatzes markierter Zellen auch in der Fraktion zwei nicht sauber zu trennen. Dies war vermutlich bedingt durch die große Malignität des B-zell-leukämischen Prozesses bei diesem

Patienten im Ansatzzeitraum. Die Markierung war wohl Ausdruck guter Stoffwechselverhältnisse und damit geringer Schädigung im Sinne der Grundkrankheit, weshalb der Anteil markierter Zellen an der Blastopoese in diesen Ansätzen konstant relativ hoch war.

Das Markierungsverhalten der großen und mittleren Lymphozyten zeigte in allen drei Ansätzen weitgehende Analogie zu dem der Immunoblasten. Dies machte es erneut sehr wahrscheinlich, daß ein gewisser Prozentsatz zu Blasten sich umsetzender T-Zellen in Form von "transitional cells" (61, 175) in diesen beiden Zellfraktionen erschien.

Der Markierungsindex der Pyknosen fiel in allen drei Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Kulturende konstant ab, während die Absolutzahl markierter Zellen anstieg. Da bis zum Tag 4 die Mehrzahl der Pyknosen aus der Blastopoese stammte, war zu frühen Terminen entsprechend der Zusammensetzung des transformierenden Compartiments der Markierungsindex hoch, die Absolutzahl der markierten Pyknosen wegen der Geringfügigkeit des Zelluntergangs klein. Im Kulturverlauf dagegen nahm insbesondere zu späteren, durch natürliche Zellinvolution gekennzeichneten Terminen der Markierungsindex ab, da nicht markierte Zellen in stärkerem Maße als markierte zugrunde gingen; die Absolutzahl der markierten dagegen nahm wegen des erheblichen Involutionsausmaßes zu.

Pat.S.W. S47PHA
CLL

ΔKL XLB
●ML oP
▲GL
Legende

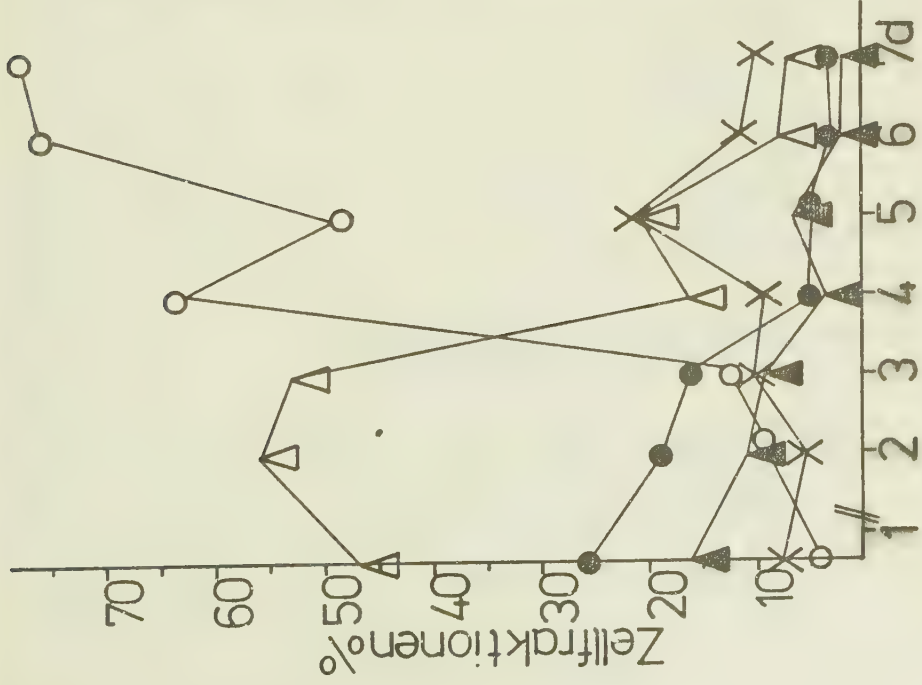
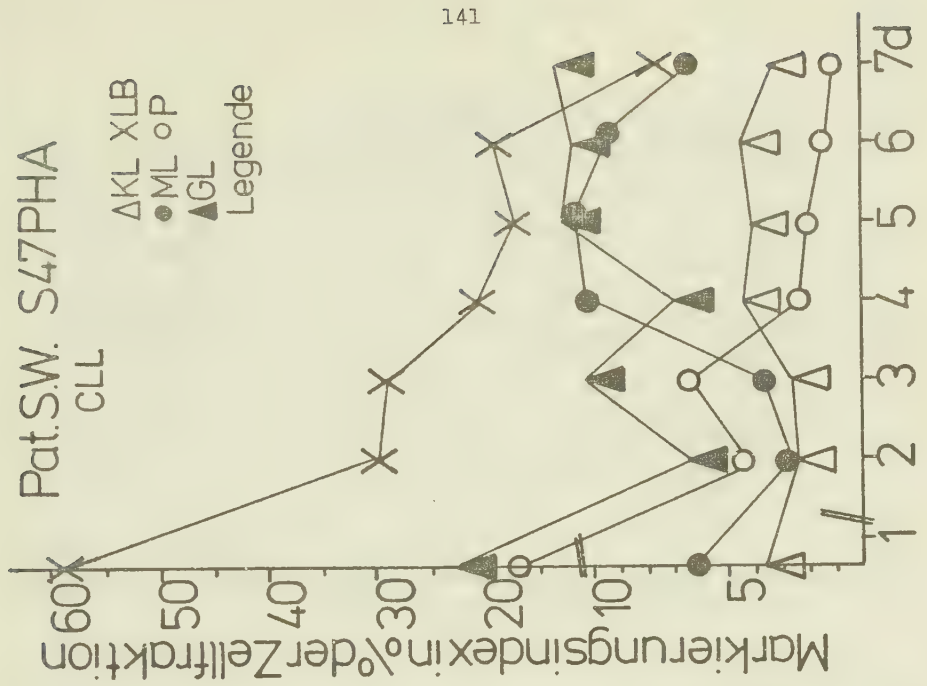


Tabelle I Pat. S.W. S 47 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	2	3	4	5	6	7
KI=kleine Lymphozyten	21	20	14	21	17	24	22
ML=mittlere Lymphozyten	41	28	23	23	26	17	26
GL=große Lymphozyten	43	37	41	20	35	47	37
LB=Lympho- blasten	45	47	40	35	50	40	45
P=Pyknosen	9	9	10	13	11	12	10

Tabelle II Pat. S.W. S 47 PHA CLL

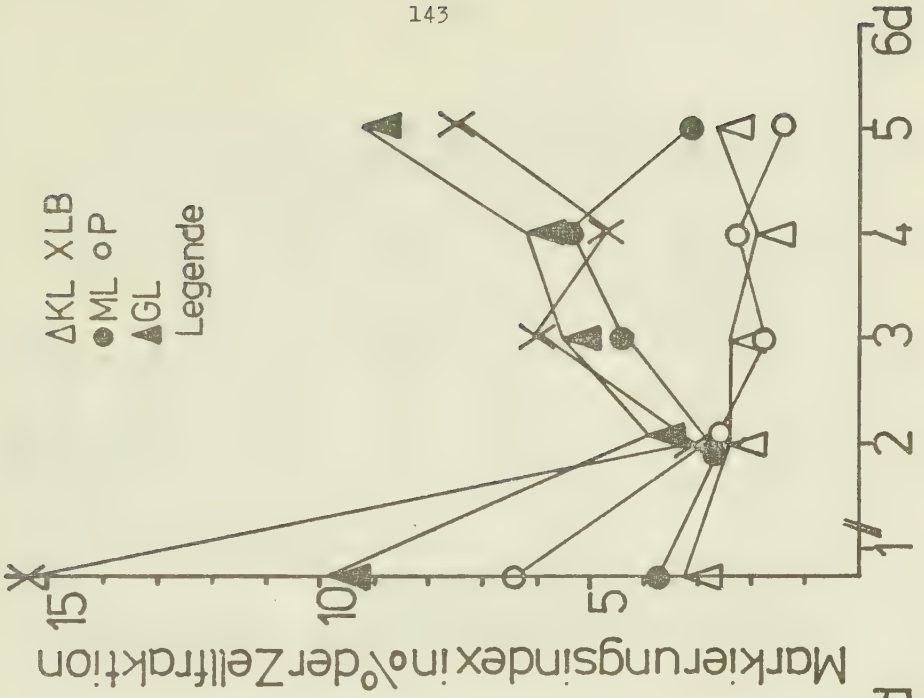
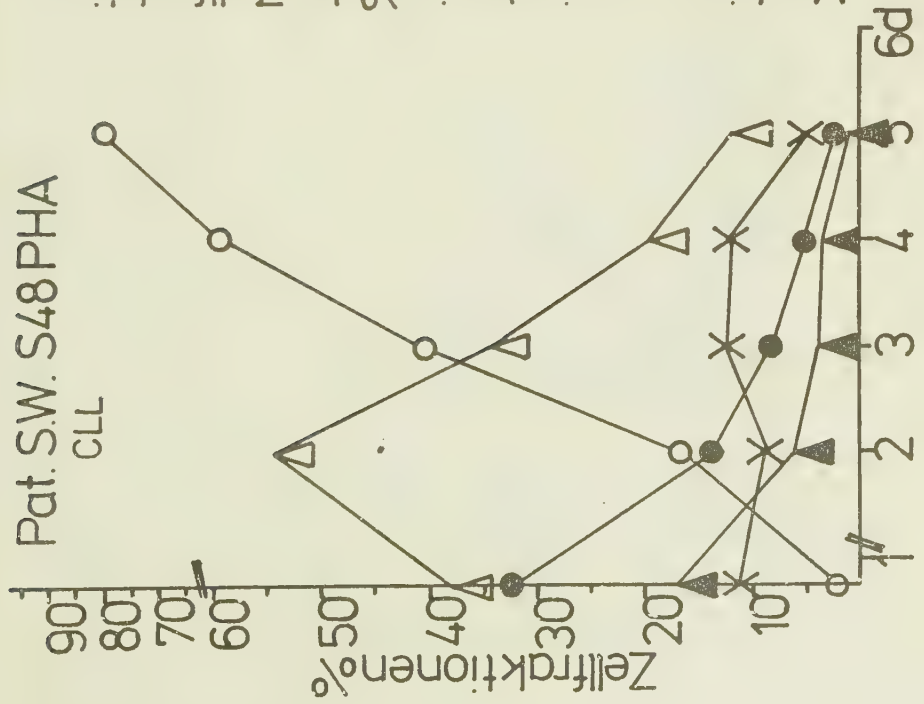
Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	2	3	4	5	6	7
KI=kleine Lymphozyten	17	14	14	7	8	3	2
ML=mittlere Lymphozyten	16	5	6	5	5	3	2
GL=große Lymphozyten	35	7	9	2	7	2	2
LB=Lympho- blasten	44	17	28	20	37	22	8
P=Pyknosen	8	4	8	16	10	13	10

Tabelle III Pat. S.W. S 47 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	2	3	4	5	6	7
Freie Zellen	18,98	1,90	2,96	10,76	4,34	13,69	24,55
Zellen in Agglutinat	81,02	98,10	97,04	89,24	95,66	86,31	75,45



ΔKL XLB
●ML oP
▲AGL
Legende

Tabelle I Pat. S.W. S 48 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	21	17	15	24	12
ML=mittlere Lymphozyten	28	33	18	29	23
GL=große Lymphozyten	36	24	29	21	18
LB=Lympho- blasten	44	31	63	38	41
P=Pyknosen	9	9	10	12	9

Tabelle II Pat. S.W. S 48 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	2	3	4	5
KL=kleine Lymphozyten	13	13	8	4	3
ML=mittlere Lymphozyten	12	4	1	1	1
GL=große Lymphozyten	16	2	2	2	1
LB=Lympho- blasten	17	3	8	6	4
P=Pyknosen	1	4	8	13	11

Tabelle III Pat. S.W. S 48 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	2	3	4	5
Freie Zellen	31,53	5,65	6,47	9,57	9,13
Zellen in Agglutinat	68,47	94,65	93,53	90,43	90,87

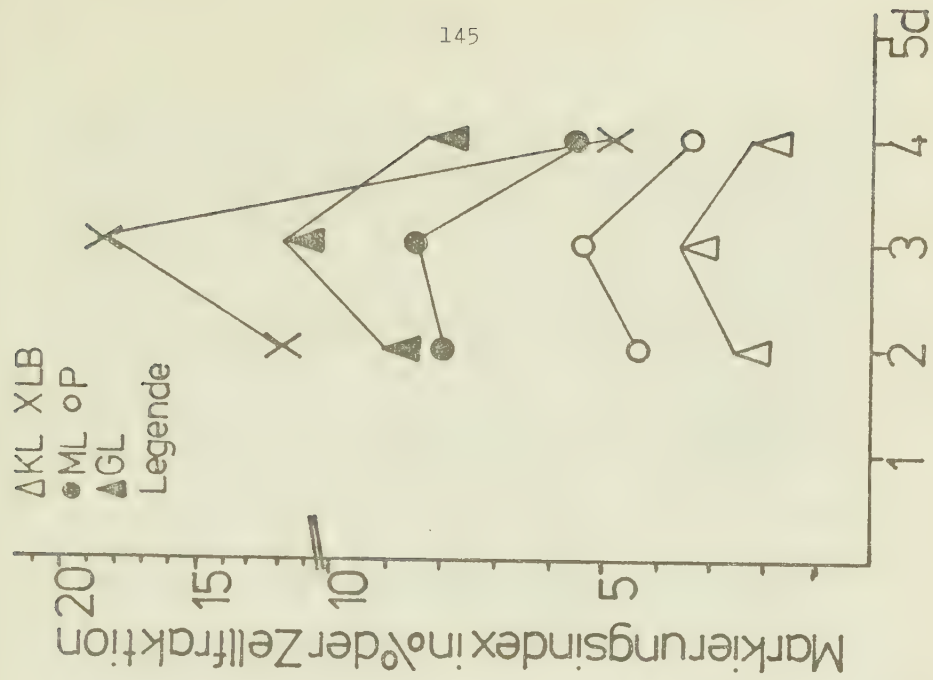
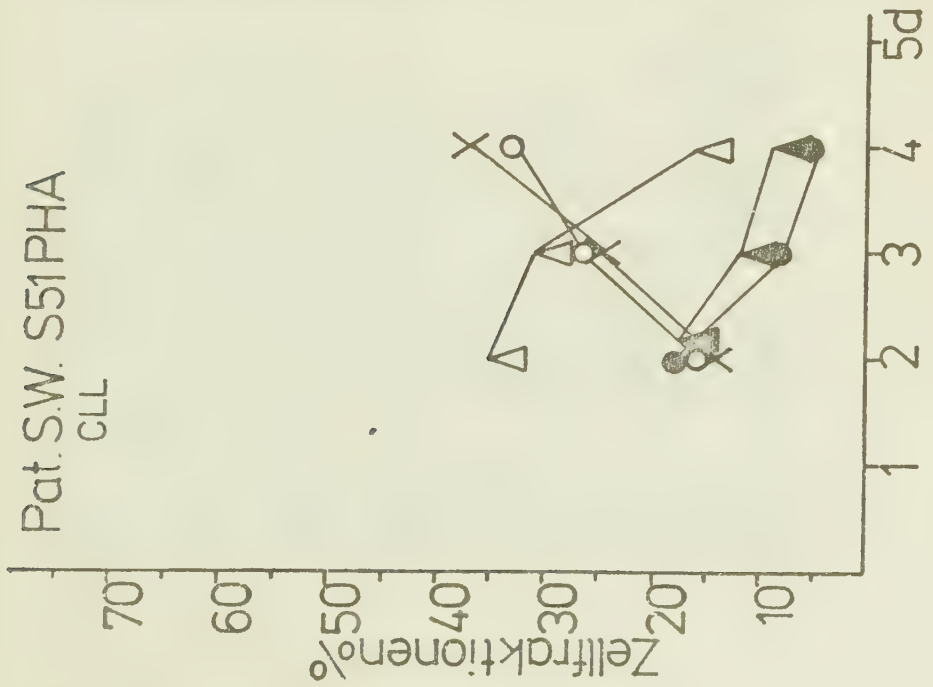


Tabelle I Pat. S.W. S 51 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	2	3	4
KL=kleine Lymphozyten	21	17	12
ML=mittlere Lymphozyten	21	23	22
GL=große Lymphozyten	25	31	29
LB=Lympho- blasten	74	24	27
P=Pyknosen	11	12	14

Tabelle II Pat. S.W. S 51 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	2	3	4
KL=kleine Lymphozyten	9	11	3
ML=mittlere Lymphozyten	10	"	"
GL=große Lymphozyten	15	13	7
LB=Lympho- blasten	18	47	18
P=Pyknosen	7	14	12

Tabelle III Pat. S.W. S 51 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	2	3	4
Freie Zellen	22,90	25,82	15,31
Zellen in Agglutinat	77,10	74,18	84,61

4.25 Patientin K.C.:

4.251 Zellbewegungen: (s.Graphik S 53) Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten zeigt relative Konstanz im Kulturverlauf.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten hält sich bei geringfügigen Schwankungen um 5 % im Kulturverlauf konstant.

Analoges Verhalten zeigt die Fraktion der großen Lymphozyten, wobei ihre Bewegungsdynamik noch geringer ist.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten fällt zwischen Tag 0 und 1 leicht ab, um dann zum Kulturende nochmals geringfügig anzusteigen.

Der relative Pyknosenanteil steigt zwischen Tag 0 und 3 geringfügig aber konstant an.

4.252 Markierungsverhalten: (s.Graphik und Tabellen I und II S 53) Markierungsindex, Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten und Markierungsintensität dieser Fraktion zeigen Konstanz im Kulturverlauf.

Markierungsindex und Absolutzahl markierter mittlerer Lymphozyten fallen zwischen Tag 0 und 1 leicht ab, um zum Kulturende wieder anzusteigen, während die Markierungsintensität im Kulturverlauf konstant bleibt.

Die große Fraktion verhält sich bezüglich aller drei Markierungsparameter analog.

Der Markierungsindex der Immunoblasten fällt zwischen Tag 0 und 2 steil ab und steigt dann zum Tag 3 wieder an.

Die Absolutzahl der markierten Blasten fällt ebenfalls zwischen Tag 0 und 1 leicht ab und steigt dann zwischen Tag 1 und 3 wieder leicht an. Die Blastenmarkierungsintensität ist am Tag 0 und 1 hoch, fällt zum Tag 2 ab und bleibt dann konstant.

Der Pyknosenmarkierungsindex fällt zwischen Tag 0 und 1 ab, steigt zum Tag 2 erneut an und fällt zum Tag 3 wieder ab. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen verhält sich analog, während die Markierungsintensität dieser Fraktion im Kulturverlauf konstant bleibt.

4.253 Agglutinationseffekt: (s. Tabelle III S 53) Mit 24,83 % findet sich am Tag 0 ein für PHA-stimulierte Kulturen extrem niedriger Zellprozentatz in Agglutinen. Erst zum Tag 1 ist ein relativ hoher Agglutinatprozentatz erreicht, der bei geringfügigem Anstieg bis zum Tag 3 konstant bleibt.

4.254 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 53): Die ausgesprochen langsame Entstehung von Zellagglutinen wies auf ein verzögertes Ansprechen der CLL-Lymphozyten auf PHA hin. Die Konstanz des einmal erreichten Agglutinatprozentatzes im Kulturverlauf sprach gegen gestörte Vitalbedingungen der Zellen unter PHA-Wirkung.

Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten blieb zwischen Tag 0 und 3 bei insgesamt geringfügigem Abfall zwischen Tag 1 und 3 im Kulturverlauf relativ konstant. Entsprechend fand sich nahezu keine PHA-abhängige

Blastentransformation. Der relative Blastenanteil betrug am Tag 2 3,48 % und am Tag 3 2,38 % und lag damit nur geringfügig über den Ergebnissen der nicht stimulierten Vergleichskultur S 53 OPHA. Der Anteil der "Frühblasten" war mit 8,71 % ebenfalls etwas niedriger als in anderen CLL-Kulturen. Die schlechte Blastenbildung korrelierte gut mit der Malignität des Krankheitsprozesses bei dieser Patientin. Das Knochenmark wies eine massive lymphatische Infiltration auf, im peripheren Blut fand sich eine Leukozytose von 800 000 - 900 000, meist Lymphozyten. Auf 400 Lymphozyten kam ein segmentkerniger Granulozyt (s.auch 2.523).

Der Zusammenhang von kleinen Lymphozyten und Immunoblasten im Sinne eines Übergangs kleiner Elemente in die Blastenfraktion wurde in diesem Ansatz im negativen Sinn deutlich. Es fand sich nur eine geringfügige Blastopoese und somit auch nur eine unbedeutende Verminderung des relativen Anteils der kleinen Lymphozyten. Die verzögerte Transformation zu späten Terminen war aufgrund fehlender Ansätze nicht zu beurteilen.

Wegen der geringfügigen Bewegungen der großen und mittleren Lymphozyten konnte auch in diesem Ansatz eine stärkere Beteiligung beider Fraktionen an der Blastopoese ausgeschlossen werden. Das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) war aufgrund der Zellbewegungen nur undeutlich zu erkennen, was wegen der geringen Blastopoese den Erwartungen entsprach, aufgrund des blastenenanalogen Markierungsverhaltens beider Fraktionen aber sehr wahrscheinlich

Der Anstieg des relativen Pyknosenanteils zwischen den Tagen 0 und 3 war nur geringfügig. Dies sprach einmal

für ungestörte Vitalbedingungen der CLL-Lymphozyten in diesem Ansatz. Der steilste Anstieg war zwischen Tag 2 und 3 zu beobachten, was wohl als Ausdruck einer Störung der ohnehin geringen Blastopoese zu werten war und gut mit der Malignität des Krankheitsprozesses bei dieser Patientin korrelierte. Der geringe Pyknosenanstieg bis zum Tag 3 in Korrelation mit einer kleinen Blastopoese-rate bestätigte die bereits beschriebene Beobachtung, daß Pyknosen jedenfalls bis zum Tag 3 bzw. 4 vor allem aus der Blastopoese stammten.

Markierungsindex und Absolutzahl kleiner Lymphozyten zeigten Konstanz im Kulturverlauf, während in allen anderen Ansätzen des CLL-Kollektivs die Absolutzahl bei Konstanz des Markierungsindex im Kulturverlauf abfiel. Dieses Markierungsverhalten entsprach der geringen Umsatzaktivität der kleinen Lymphozyten.

Der Markierungsindex und die Absolutzahl markierter Immunoblasten fielen zwischen Tag 0 und 2 ab, um zwischen Tag 2 und 3 nochmals leicht anzusteigen. Sie entsprachen damit den im Rahmen der Untersuchung gemachten Beobachtungen bezüglich dieser beiden Parameter.

Es fanden sich also im Ansatz S 53 zwei Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen auftretende bestand wie ausgeführt wahrscheinlich nicht aus echten Immunoblasten, sondern entsprach einer Population bereits zirkulierender hochmarkierter großer Lymphozyten mit blastoidem Zellcharakter. Sie machte am Tag 0 8,71 % der Gesamtzellzahl aus.

Die am 4. Tag auftretenden Blasten waren als das Ergebnis einer PHA-abhängigen Transformation im Sinne der CLL nicht oder nur geringfügig geschädigter kleiner T-Zellen zu werten.

Ihr Markierungsindex lag niedriger als der der "Frühblasten", aber doch deutlich höher als der von Normalblasten im gleichen Zeitraum (s.dort). Auch ihre Markierungsintensität war deutlich geringer als die der "Frühblasten".

Das relativ blastenanaloge Markierungsverhalten der mittleren und großen Fraktion sprach für das Auftreten von "transitional cells" (61, 175). Daß ihre Zahl gering und deshalb ihr Erscheinen in den Zellbewegungen nur undeutlich zu erkennen war, lag am allgemein minimalen Umfang der Blastopoese.

Der Abfall des Pyknosenmarkierungsindex im Kulturverlauf entsprach der Zusammensetzung des transformierenden T-Zellcompartiments und war ein weiterer Beweis für die Herkunft der Frühpyknosen aus der Blastopoese. Der Anstieg des Markierungsindex und der Absolutzahl markierter Pyknosen zwischen Tag 1 und 2 war vermutlich darauf zurückzuführen, daß zu frühen PHA-Transformationsterminen in größerem Umfang markierte T-Zellen zum Umsatz kamen, während am Tag 3 und 4 die Zahl nicht markierter transformierender Zellen deutlich zunahm. Letzteres kam auch zum Ausdruck durch den Wiederabfall des Markierungsindex zwischen Tag 2 und 3 bei geringgradiger Verminderung markierter Pyknosen im gleichen Zeitraum in Korrelation mit einem deutlichen Anstieg des relativen Pyknosenanteils.

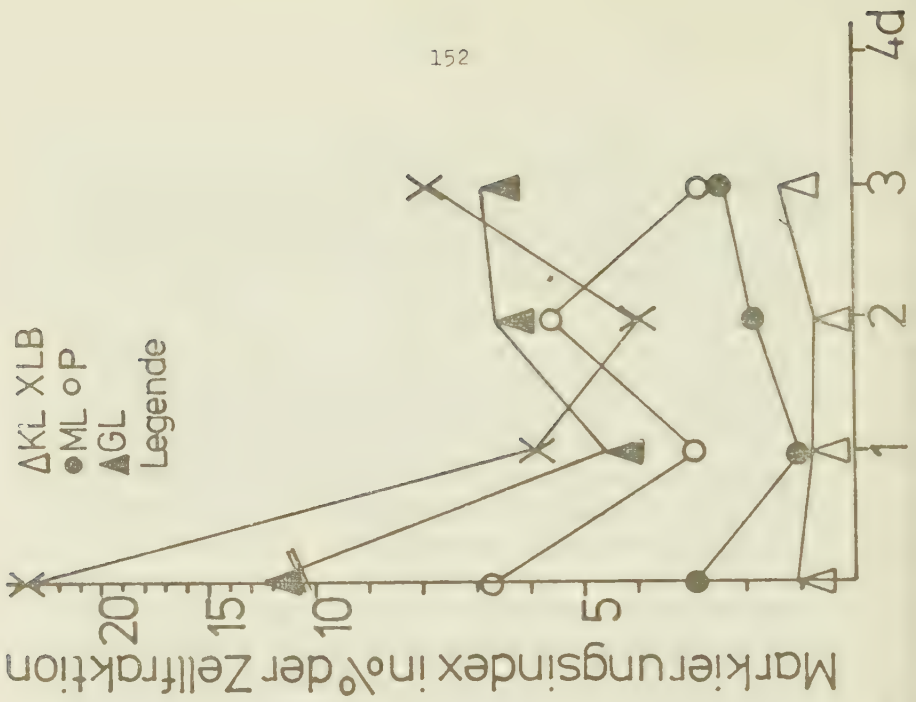
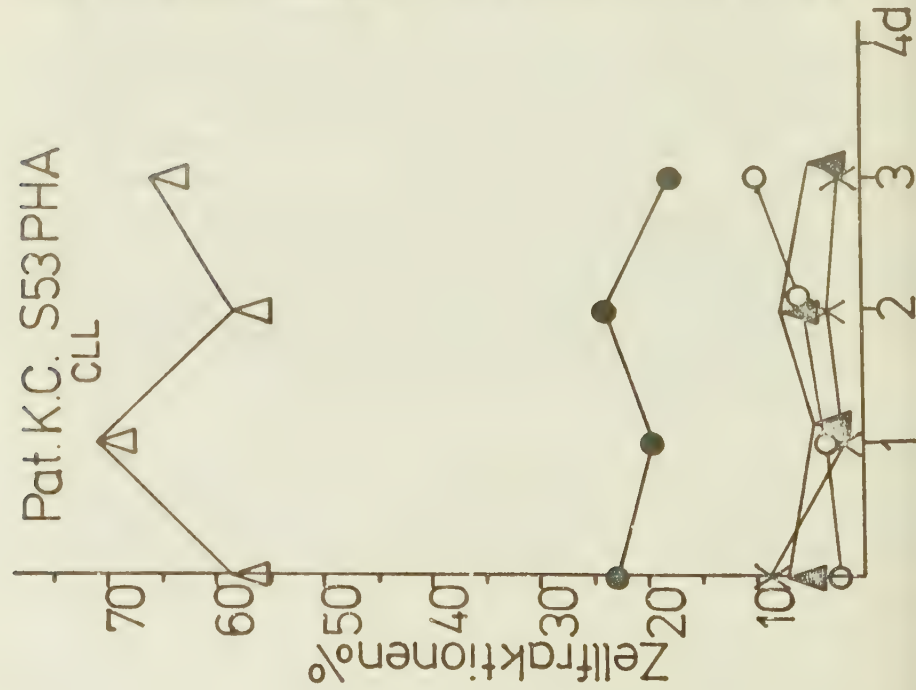


Tabelle I Pat. K.C. S 53 PHA CLL

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	1	2	3
KL=kleine Lymphozyten	14	20	12	15
ML=mittlere Lymphozyten	15	18	17	22
GL=große Lymphozyten	20	20	22	19
LB=Lympho- blasten	58	51	30	29
P=Pyknosen	9	7	9	10

Tabelle II Pat. K.C. S 53 PHA CLL

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	1	2	3
KL=kleine Lymphozyten	6	6	4	8
ML=mittlere Lymphozyten	7	2	5	5
GL=große Lymphozyten	9	2	5	3
LB=Lympho- blasten	21	1	2	2
P=Pyknosen	2	1	4	3

Tabelle III Pat. K.C. = 53 PHA CLL

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	1	2	3
Freie Zellen	75,17	10,83	11,85	5,95
Zellen in Agglutinat	24,83	89,17	88,15	94,05

4.26 Patient R.A. (Knochenmarkkulturen):

4.261 Zellbewegungen: (s. Graphiken S 4, S 6) Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Tag 3 relativ konstant, fällt in S 4 zwischen Tag 3 und 4 steil ab, steigt zum Tag 5 wieder an und fällt dann kontinuierlich, zwischen Tag 6 und 8 mit großer Steilheit, zum Kulturende hin ab.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten und der großen Lymphozyten hält sich bei konstanten Prozentsätzen zwischen 5 und 10 % in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

Der prozentuale Anteil der Lymphoblasten fällt im Ansatz S 6 zwischen Tag 0 und 1 leicht ab und steigt dann in beiden Ansätzen zwischen Tag 1 und 3 konstant an; der Anstieg erreicht in S 4 zwischen Tag 3 und 4 die größte Steilheit, es erfolgt ein Abfall zwischen Tag 4 und 6 und schließlich nochmals ein steiler Anstieg zwischen Tag 6 und 8.

In beiden Ansätzen bleibt der relative Pyknosenanteil zwischen Kulturbeginn und Tag 3 relativ konstant. Er steigt dann in S 4 zwischen Tag 3 und 6, besonders steil zwischen Tag 5 und 6, und bleibt zwischen Tag 6 und dem Kulturende relativ konstant.

4.262 Markierungsverhalten: (s. Graphiken und Tabellen I und II S 4, S 6) Markierungsindex, Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten und Markierungsintensität dieser Fraktion zeigen Konstanz im Kulturverlauf in beiden Ansätzen.

Der Markierungsindex und die Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten steigen in beiden Ansätzen bis zum Tag 3 leicht an, fallen in S 4 zum Tag 4 wieder leicht ab, steigen dann zum Tag 5 erneut an und fallen zum Kulturrende konstant ab. Die Markierungsintensität hält sich in beiden Ansätzen mit Ausnahme eines relativ hohen Wertes am Tag 0 in S 6 im Kulturverlauf konstant.

Der Markierungsindex der großen Lymphozyten steigt in S 6 zwischen Tag 0 und 1 leicht an, obwohl die Absolutzahl markierter großer Lymphozyten sich deutlich vermindert. Er fällt dann zum Tag 2 ab und beide Parameter steigen erneut zum Tag 3 deutlich an. In S 4 dagegen ist bei leichtem Abfall zwischen Tag 2 und 3 ein konstanter Anstieg zwischen Tag 1 und 4 zu beobachten. Zum Tag 5 erfolgt ein Abfall des Index bei Konstanz der Absolutzahl, zum Tag 6 ein Wiederanstieg des Index bei Verminderung der Absolutzahl und zwischen Tag 6 und 8 verkleinern sich beide Markierungsparameter. Die Markierungsintensität ist mit Ausnahme eines relativ hohen Wertes in S 6 am Tag 0 und in S 4 am Tag 1 im Kulturverlauf relativ konstant.

In S 6 fallen Markierungsindex und Absolutzahl markierter Immunoblasten zwischen Tag 0 und 3 konstant ab. In S 4 ist ein leichter Anstieg beider Parameter zwischen Tag 1 und 2 zu beobachten, der Markierungsindex fällt dann zum Tag 4 ebenfalls deutlich ab, während die Absolutzahl markierter Zellen konstant ansteigt. Zwischen Tag 4 und 6 dagegen erfolgt ein Anstieg des Markierungsindex bei deutlichem Abfall der Absolutzahl markierter Immunoblasten. Zwischen Tag 6 und 8 fällt der Markierungsindex bei Konstanz der Absolutzahl. Die Markierungsintensität der Blasten ist in beiden Ansätzen von hohen Frühwerten abgesehen konstant.

Der Markierungsindex der Pyknosen fällt in beiden Ansätzen zunächst leicht ab und bleibt dann mit Ausnahme eines relativ deutlichen Anstiegs bei S 4 zwischen Tag 4 und 5 im Kulturverlauf relativ konstant. Die Absolutzahl markierter Pyknosen ist zunächst konstant und steigt dann in beiden Ansätzen zum Kulturende an, wobei in S 4 der Anstieg zwischen Tag 4 und 5 verhältnismäßig deutlich ist. Die Markierungsintensität der Pyknosen zeigt Konstanz im Kulturverlauf.

4.263 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III S 4, S 6)

Ein relativ hoher Agglutinatprozentsatz wird in beiden Ansätzen erst am Tag 2 erreicht. Dieser Prozentsatz bleibt dann allerdings bis zum Kulturende konstant.

4.264 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (S 4, S 6): Auch in den Knochenmarkkulturen sprachen die CLL-Lymphozyten, wie am Agglutinatprozentsatz erkennbar war, verzögert auf PHA an. Die Konstanz des einmal erreichten Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf sprach gegen gestörte Vitalbedingungen unter PHA-Wirkung. Der relativ geringe Anstieg des prozentualen Pyknosenanteils in S 4 bis zum Kulturende war Ausdruck günstiger Kulturverhältnisse.

Der zeitliche Zusammenfall der stärksten Verminderungen der kleinen Fraktion mit den stärksten Gewinnen der Blastenfraktion machte einen direkten Übergang kleiner Lymphozyten in Immunoblasten wahrscheinlich. Im Ansatz S 6 z.B. nahm der Anteil der kleinen Lymphozyten zwischen Tag 1 und 3

um 10 % ab, der der Immunoblasten um 9 % zu. Im Ansatz S 4 entsprach eine Verminderung der kleinen Fraktion um 18 % zwischen Tag 6 und 8 einer Zunahme der Blastenfraktion um 16 %. Dieses spiegelbildliche Verhalten war in S 4 zwischen Tag 3 und 4 nicht so deutlich ausgeprägt. Einer Verminderung der kleinen Fraktion von 23 % entsprach nur ein Blastengewinn von 12 %. Diese Differenz erklärte sich allerdings durch einen gewissen Zelluntergang im Rahmen der Blastopoese - die Pyknosenfraktion nahm um 4 % zu - sowie durch das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) in der großen (Zunahme um 4 %) und der mittleren Fraktion (Zunahme um 3 %).

Der zeitliche Zusammenfall einer Verminderung der Immunoblastenfraktion zwischen Tag 4 und 5 um 12 % bei deutlicher Zunahme des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten im gleichen Zeitraum war möglicherweise durch eine Retransformation zu erklären, wobei eventuell Blasten sich zu immunkompetenten kleinen Lymphozyten teilten.

Im Ansatz S 4 zeigte sich die verzögerte Transformation von CLL-Lymphozyten unter PHA-Wirkung mit einem Blastengipfel am Tag 4 (23,07 %) und einem Spättransformationsgipfel am Tag 8 (25,84 %) sehr deutlich.

Die träge Eigendynamik der mittleren und großen Lymphozyten in beiden Ansätzen machte eine direkte Beteiligung dieser Fraktionen an der Blastopoese unwahrscheinlich. Die Zellbewegungen beider Compartimente in bezug aufeinander und auf die übrigen Zellfraktionen sprachen allerdings für das Auftreten von Übergangsformen kleiner zu Blasten transformierender Lymphozyten im morphologischen Gewand dieser beiden Fraktionen.

Die relative Konstanz des Pyknosenprozentsatzes in S 6 im gesamten Kulturverlauf und in S 4 bis zum Tag 5 sprach wie ausgeführt gegen gestörte Vitalbedingungen der Lymphocyten unter PHA-Wirkung. Die Frühpyknosen stammten, wie die Zellbewegungen zeigten - z.B. der Anstieg des relativen Pyknosenanteils zwischen Tag 3 und 4, einem Zeitraum starker Blastenvermehrung -, vor allem aus der Blastopoese.

Ab Tag 5 setzte aber trotz günstiger Kulturbedingungen eine natürliche Zellinvolution ein, wie der deutliche Pyknosenanstieg zwischen Tag 5 und 6 zeigte. Dabei waren wohl alle Zellfraktionen mit Ausnahme der Blasten, die unseren Beobachtungen gemäß vorzugsweise durch Autolyse zugrunde gingen, gleichmäßig von der Involution betroffen.

Dies erklärte auch den geringen Erfolg der Retransformation im Ansatz S 4 in diesem Zeitraum. Da nämlich aus einem Immunblasten wohl mehrere immunkompetente kleine T-Zellen entstehen dürften, hätte der Gewinn der kleinen Fraktion größer sein müssen, als der Verlust der Blastenfraktion. Dies war nicht der Fall, da wahrscheinlich im Rahmen der Involution stärkere Zellverluste der kleinen Lymphocyten auftraten. Bei stärkerem Zelluntergang in anderen Ansätzen war wohl deshalb eine eventuell trotzdem stattfindende Retransformation in der statistischen Auswertung nicht sichtbar zu machen.

Anhand des Markierungsverhaltens der Immunblasten ließen sich auch in den Knochenmarkkulturen drei Blastenfraktionen unterscheiden. Dabei handelte es sich bei den Zellen der ersten, zu frühen Terminen auftretenden Fraktion sehr wahrscheinlich nicht um Immunblasten, sondern um hochmarkierte große Zellelemente mit blastoidem Charakter.

Die am Tag 3 und 4 auftretende Fraktion zwei entsprach bezüglich ihrer Zellelemente dem Transformationsergebnis relativ wenig pathologisch veränderter kleiner T-Zellen, die sich unter PHA-Wirkung zeitgerecht zu Immunoblasten umsetzten. Die der dritten Fraktion zugehörigen Spätblasten leiteten sich von im Sinne der Grundkrankheit vorgeschädigten kleinen T-Zellen ab, die verzögert zur Transformation kamen. Sie waren in der Regel etwas höher markiert als die zeitgerecht zu Blasten sich umsetzenden T-Zellen. Auch der absolute Anteil markierter Zellen am transformierenden Compartment war zu späten Terminen, wie der Anstieg des Blastenmarkierungsindex zeigte, größer als in der Fraktion zwei.

Der Abfall des Blastenmarkierungsindex in S 4 zwischen Tag 6 und 8 erklärte sich wohl durch die Beteiligung nicht markierter, aus der Retransformation stammender kleiner Lymphozyten an der Blastopoese, vor allem aber durch "self-feeding" (113) der Immunoblastenfraktion.

Der relativ niedrige Markierungsindex der mittleren und großen Lymphozyten zu frühen Kulturterminen war wohl durch relativ vollständige Transformation hochreaktiver markierter kleiner Lymphozyten zu Immunoblasten bedingt. Das Markierungsverhalten beider Fraktionen im weiteren Kulturverlauf war deutlich durch das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) geprägt. Dabei eilte der Anstieg des Markierungsindex der mittleren Fraktion dem der großen Fraktion um einen Tag voraus. Mit einem Anstieg des Index der großen Fraktion korrelierte ein Abfall des Index der mittleren Lymphozyten. Einen Tag später war bei Abfall des Index der großen Lymphozyten der Blastenmarkierungsindex angestiegen.

Daß der Markierungsindex der großen Fraktion über dem der mittleren Fraktion lag, - das gilt selbstverständlich auch für die übrigen Ansätze - war ein statistisches Problem und durch den kleineren Umfang der großen Fraktion bedingt. Daß der Index der Blastenfraktion in der Regel über dem aller anderen Fraktionen lag, war bedingt durch den relativ hohen Anteil markierter Zellen am sich umsetzenden Compartment.

Der Abfall des Markierungsindex der mittleren und großen Fraktion zwischen Tag 6 und 8 analog dem Abfall des Blastenmarkierungsindex war wohl durch die Zunahme des Anteils nicht markierter kleiner Lymphozyten an der Spätblastopoese zu erklären. Diese stammten vermutlich aus der beschriebenen Retransformation, denn bei der Entstehung mehrerer kleiner T-Zellen aus einem schwächer markierten Immunoblasten dürften zahlreiche Zellelemente hervorgegangen sein, die bezüglich ihrer Markierungsintensität unter der Backgroundgrenze lagen.

Das Markierungsverhalten der Pyknosenfraktion entsprach im Kulturverlauf dem des transformierenden Compartiments.

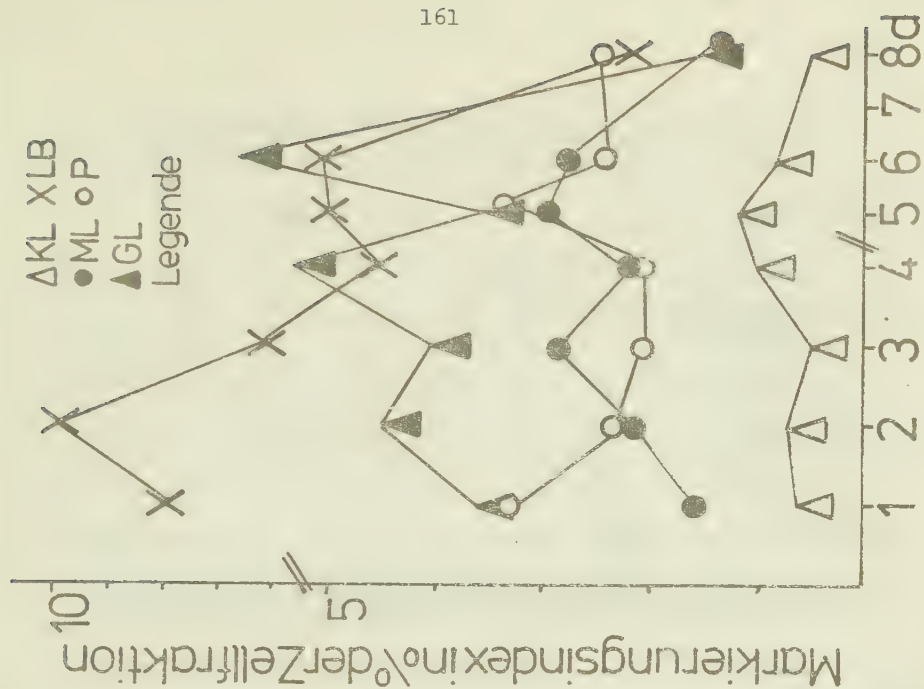
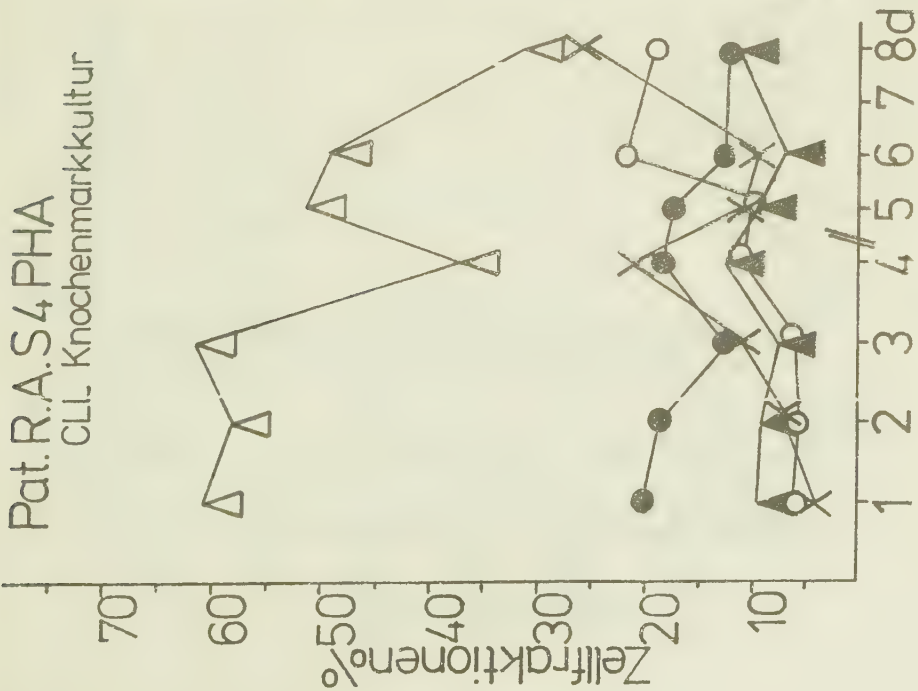


Tabelle I Pat. R.A. S 4 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	1	2	3	4	5	6	8
KL=kleine Lymphozyten	21	17	14	10	8	5	11
ML=mittlere Lymphozyten	21	18	19	26	17	22	14
GL=große Lymphozyten	44	24	31	26	24	31	32
LB=Lympho- blasten	62	81	52	43	41	25	24
P=Pyknosen	10	9	8	7	11	10	9

Tabelle II Pat. R.A. S 4 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

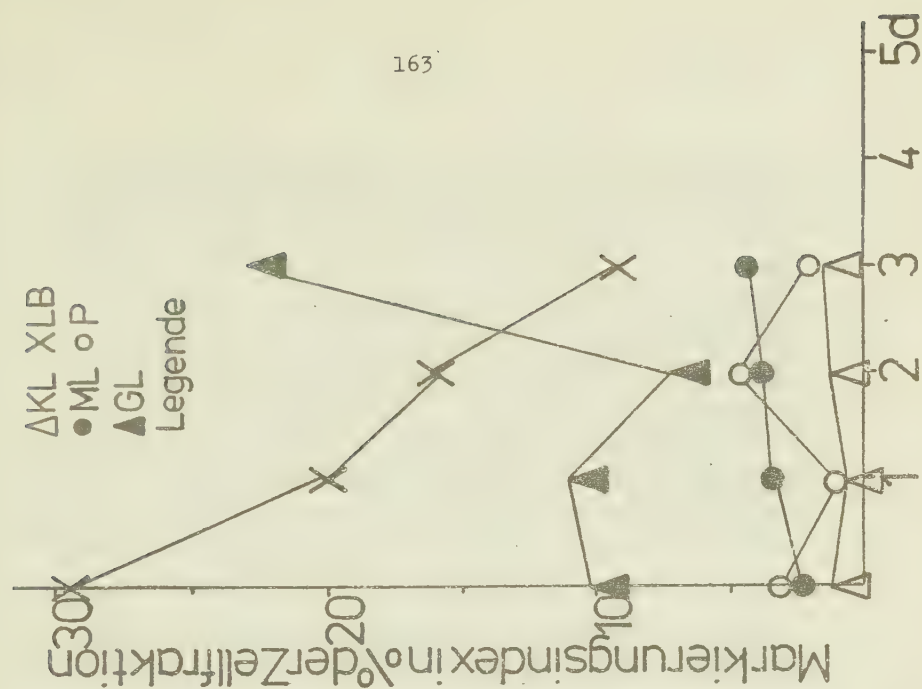
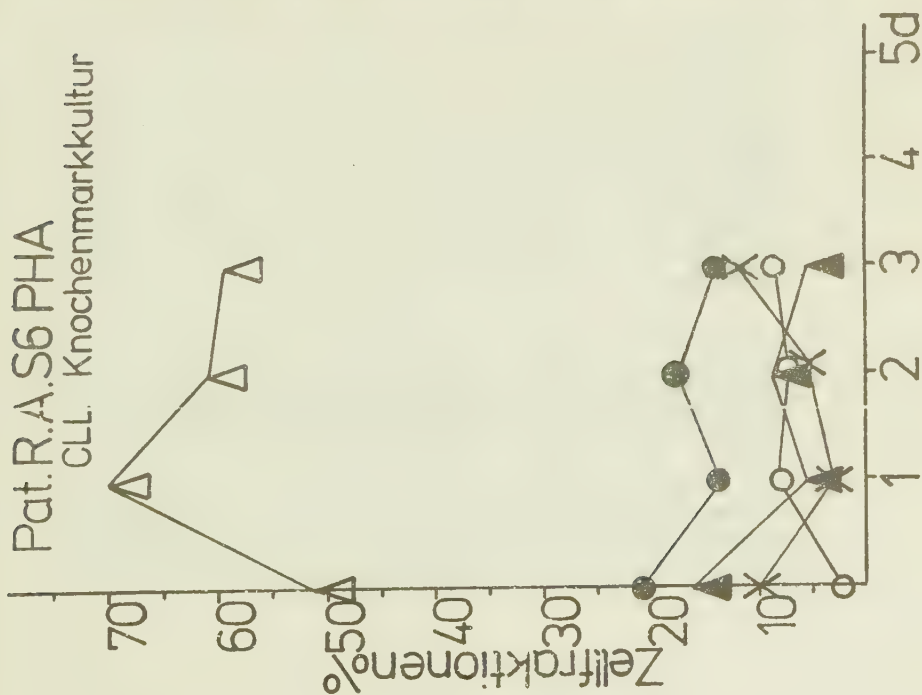
Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	1	2	3	4	5	6	8
KL=kleine Lymphozyten	4	4	3	4	6	4	2
ML=mittlere Lymphozyten	3	4	2	4	4	3	2
GL=große Lymphozyten	3	4	3	6	4	4	2
LB=Lympho- blasten	4	6	7	10	5	5	6
P=Pyknosen	2	2	2	2	4	5	5

Tabelle III Pat. R.A. S 4 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	1	2	3	4	5	6	8
Freie Zellen	11,73	2,98	3,83	3,13	1,31	4,35	2,61
Zellen in Agglutinat	88,27	97,02	96,17	96,87	98,69	95,65	97,39



Δ KL XLB
● ML o P
▲ GL
Legende

Tabelle I Pat. R.A. S 6 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	1	2	3
KL=kleine Lymphozyten	19	18	14	11
ML=mittlere Lymphozyten	44	44	47	41
GL=große Lymphozyten	59	25	31	34
LB=Lympho- blasten	54	44	48	41
P=Pyknosen	15	7	8	12

Tabelle II Pat. R.A. S 6 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	1	2	3
KL=kleine Lymphozyten	1	2	1	1
ML=mittlere Lymphozyten	5	5	7	6
GL=große Lymphozyten	16	6	5	12
LB=Lympho- blasten	29	18	14	11
P=Pyknosen	1	1	3	2

Tabelle III Pat. R.A. S 6 PHA CLL (Knochenmarkkultur)

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	1	2	3
Freie Zellen	20,19	21,46	7,90	1,10
Zellen in Agglutinaten	79,81	78,54	92,10	98,90

4.27 Lymphozytenkinetik bei CLL-Patienten: CLL-Lymphozyten sprechen ungleichmäßig verzögert, allerdings ohne Störung ihrer Vitalität auf PHA an.

Vorzugsweise kleine Lymphozyten setzen sich unter Wirkung dieses Antigens zu Immunblasten um. Daneben gehen in geringem Umfang im Sinne eines "self-feeding" (113) Blasten aus Blasten hervor. Stark markierte Zellen setzen sich in größerem Umfang früher als schwächer und nicht markierte zu Immunblasten um. Im Durchschnitt ist bei der CLL der Prozentsatz markierter T-Zellen im sich umsetzenden Compartment stets etwas höher als bei Normallymphozyten.

Es gibt drei Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen auftretende entspricht eventuell dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher handelt es sich bei diesen Zellen aber nicht um echte Immunblasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender Zellen von Blastengröße mit in vivo erworbener hoher Markierungsintensität, was wohl als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu deuten ist. Diese Fraktion der "Frühblasten" macht zu Kulturbeginn wie bei Normalpatienten maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus. Ihr Markierungsindex liegt hoch über dem der kleinen Lymphozyten.

Die zweite Immunblastenfraktion tritt am Tag 3 und 4 auf, wobei der Transformationsgipfel im Gegensatz zu Normallymphozyten in der Regel leicht verzögert am Tag 4 beobachtet wird. Diese Blasten finden sich also um den Zeitpunkt der in Normalkulturen beobachteten Haupttransformation. Sie sind das Ergebnis einer PHA-abhängigen Transformation kleiner T-Zellen, die in ihrer Antigenansprechbarkeit durch den Krankheitsprozeß nicht

oder nur wenig beeinträchtigt sind. Markierungsindex und Markierungsintensität dieser Zellen sind deutlich niedriger als bei den "Frühblasten". Das Umsatzergebnis der zeitgerechten PHA-Transformation ist erheblich geringer als in Normalkulturen. Die Immunblasten dieser Fraktion erreichen um den 3. - 4. Tag nur 15 - 25 %igen Anteil an der Kulturzellzahl.

Die dritte Blastenfraktion entspricht dem Transformationsergebnis kleiner, in ihrer PHA-Ansprechbarkeit eingeschränkter T-Zellen, die zu späten Terminen verzögert zum Umsatz kommen. Markierungsindex und Markierungsintensität liegen in der Regel etwas höher als bei den Immunblasten der Fraktion zwei.

Im Gegensatz zu Normallymphozyten weisen die CLL-T-Zellen keine Haupttransformation auf. Vielmehr findet sich unter PHA-Wirkung eine am Tag 3 beginnende, sich bis zum Kulturende hinziehende verzögerte Transformation, die zwei Gipfel - den ersten zwischen Tag 3 und 4 und den zweiten zwischen Tag 6 und 8 - aufweist. Für den zwischen Tag 6 und 8 zu beobachtenden Spättransformationsgipfel dürften folgende Ursachen wesentlich sein: günstige räumliche Bedingungen für den mitoseinduzierenden Faktor MIF durch starken Zelluntergang; Beteiligung von relativ wenig geschädigten aus der Retransformation von 72 - 96 h-Blasten stammenden kleinen Lymphozyten an der Blastopoese; akkumulatives Auftreten von sehr langsam sich umsetzenden, die mittlere und große Fraktion durchwandernden Zellen in der Blastenfraktion; "self-feeding" (113) der Immunblasten.

Der Erfolg der Blastopoese bei CLL-Lymphozyten ist der Malignität des B-zell-leukämischen Prozesses, dessen un-

mittelbar klinisch faßbares pathologisch-anatomisches Substrat die periphere Lymphozytose ist, umgekehrt proportional. Bei Zunahme der Malignität verschiebt sich der Umsatz zunächst in Richtung verzögerte Transformation, da die Zahl der nicht geschädigten T-Zellen abnimmt. Schließlich kommt es korrelierend mit einer Verminderung überhaupt noch umsatzfähiger T-Zellen zu einer absoluten Abnahme des relativen Blastenanteils.

Wie bei Normallymphozyten beteiligen sich mittlere und große Fraktion allenfalls in geringem Ausmaß an der Blastopoese, wobei sich die großen Lymphozyten noch träger verhalten als die mittleren. Die Zahl der kleinen T-Zellen, die sich langsam zu Blasten umsetzen und als "transitional cells" (61, 175) in diesen beiden Fraktionen erscheinen, ist etwas größer als in Normalkulturen. Dies ist besonders im Rahmen der verzögerten Transformation deutlich.

Die Pyknosen stammen bis zum Tag 4 vor allem aus der Blastopoese. Dies wird besonders am Verhalten des Pyknosenmarkierungsindex deutlich, der der jeweiligen Zusammensetzung des transformierenden T-Zellcompartiments entspricht. Etwa ab Tag 5 setzt ein generalisierter, durch sich verschlechternde Kulturbedingungen verursachter Zelluntergang ein, von dem nicht markierte Zellen relativ stärker betroffen sind als markierte. Dies zeigt sich in einer Konstanz bzw. einem Abfall des Pyknosenmarkierungsindex bei Anstieg der Absolutzahl markierter Pyknosen und des relativen Pyknosenanteils.

4.3 Lymphogranulomatose

4.31 Patientin A.R.:

4.311 Zellzusammensetzung: Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten liegt am Tage 0 verhältnismäßig niedrig, bleibt zu frühen Kulturterminen weitgehend konstant, fällt zwischen Tag 3 und 4 deutlicher ab und steigt dann zwischen Tag 4 und dem Kulturende am Tag 7 kontinuierlich an.

Der prozentuale Anteil der mittleren Lymphozyten ist mit 41,15 % am Tag 0 (s.Graphik S 24) unverhältnismäßig hoch, fällt zwischen Tag 0 und 3 deutlich ab und bleibt dann im weiteren Kulturverlauf bei Schwankungen unter 10 % relativ konstant.

Der prozentuale Anteil der großen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl bleibt bei Schwankungen knapp über 5 % im gesamten Kulturverlauf weitgehend konstant.

Der relative Immunoblastenanteil steigt zwischen Tag 0 und 3 langsam, zwischen Tag 3 und 4 deutlich an, fällt dann zwischen Tag 4 und 5 leicht, zwischen Tag 5 und 6 deutlich und zwischen Tag 6 und 7 wieder leicht ab.

Der prozentuale Anteil der Pyknosen an der Gesamtzellzahl steigt zwischen Tag 0 und 3 an, fällt zwischen Tag 3 und 4 ab und steigt dann zum Kulturende kontinuierlich an.

4.312 Markierungsverhalten: (s.Graphik und Tabellen I und II S 24) Markierungsindex und Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten steigen zwischen Tag 0 und 3 an, fallen zum Tag 5 wieder ab, steigen zwischen Tag 5 und 6

erneut an und fallen zum Kulturende ab. Die Markierungsintensität der kleinen Lymphozyten zeigt deutliche Schwankungen im Kulturverlauf.

Der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten steigt zwischen Tag 0 und 4 an, fällt zwischen Tag 4 und 5 steil ab und steigt dann zum Kulturende wieder leicht an. Die Absolutzahl markierter mittlerer Lymphozyten fällt zwischen Tag 0 und 3 ab, steigt zwischen Tag 3 und 4 an, fällt zwischen Tag 4 und 5 erneut deutlich ab und bleibt dann bis zum Kulturende relativ konstant. Die Markierungsintensität der mittleren Lymphozyten zeigt deutliche Schwankungen im Kulturverlauf.

Der Markierungsindex der großen Lymphozyten steigt zwischen Tag 0 und 3 an, fällt zwischen Tag 3 und 4 ab und steigt dann zum Kulturende sehr stark an. Die Absolutzahl markierter großer Lymphozyten steigt zwischen Tag 0 und 4 an und bleibt dann im weiteren Kulturverlauf konstant. Die Markierungsintensität fällt deutlich zwischen Tag 0 und 4 ab und steigt dann zum Kulturende wieder leicht an.

Der Blastenmarkierungsindex fällt zwischen Tag 0 und 3 deutlich ab, steigt zwischen Tag 3 und 5 ebenso deutlich wieder an und bleibt dann bis zum Kulturende konstant. Die Absolutzahl markierter Immunoblasten ist bis zum Tag 3 relativ konstant, steigt zwischen Tag 3 und 4 deutlich an, fällt zwischen Tag 5 und 6 ebenso deutlich wieder ab und bleibt bis zum Kulturende konstant. Die Markierungsintensität fällt deutlich zwischen Tag 0 und 4 ab, steigt zwischen Tag 4 und 5 wieder an und bleibt bis zum Kulturende weitgehend konstant.

Der Pyknosenmarkierungsindex steigt zwischen Tag 0 und 3 leicht, zwischen Tag 3 und 4 steil an, fällt zwischen Tag 4 und 5 ebenso steil wieder ab, um dann zum Kulturreise erneut anzusteigen. Die Absolutzahl markierter Pyknosen steigt zwischen Tag 0 und 3 steil an, bleibt bis zum Tag 4 relativ konstant, fällt zum Tag 5 deutlich ab und steigt zwischen Tag 5 und dem Kulturreise erneut an. Die Markierungsintensität der Pyknosen zeigt Konstanz im Kulturverlauf.

4.313 Agglutinationseffekt: (s. Tabelle III S 24) Der Prozentsatz der in Agglutinaten liegenden Zellen erreicht in beiden Ansätzen erst am Tag 3 den Normallymphozyten vergleichbare Werte von mehr als 85 %. Dieser Prozentsatz bleibt dann im weiteren Kulturverlauf relativ konstant.

4.314 Diskussion der Zellveränderungen bei den Markierungsverhältnissen von Lymphogranulomatose-Lymphozyten auf PHA-Wirkung (S 24): Die verhältnismäßig geringe Bildung von Zellagglutinaten im Ansatz S 24 wies auf ein verzögertes Ansprechen von Lymphogranulomatose-Lymphozyten auf PHA hin. Gestörte Vitalbedingungen der Lymphozyten unter PHA-Wirkung konnten wegen der relativ geringen Schwankungen des verzögert erreichten Agglutinatprozentsatzes im Kulturverlauf weitgehend ausgeschlossen werden.

Der hohe prozentuale Anteil mittlerer Lymphozyten bei relativ geringem prozentualem Anteil der kleinen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl am Tag 0 war ziemlich sicher auf einen Auswertungsartefakt zurückzuführen. Infolge großer Projektion wurden wohl zahlreiche kleine Zellelemente fälschlicherweise zur mittleren Fraktion gezählt.

Der zeitliche Zusammenfall der deutlichsten Verminderung des prozentualen Anteils der kleinen Lymphozyten mit den stärksten Gewinnen der Immunoblasten ließ auch bei der Lymphogranulomatose einen direkten Zusammenhang dieser beiden Fraktionen im Sinne eines Übergangs von kleinen Lymphozyten in Immunoblasten annehmen. So entsprach einer Zunahme der Blastenfraktion um 6,40 % von 12,15 % auf 18,55 % zwischen Tag 3 und 4 ein Verlust der kleinen Fraktion von 7,02 % von 46,52 % auf 39,50 %.

Im Gegensatz zur CLL und in Übereinstimmung mit den bei Normalpatienten erhobenen Befunden zeigte sich ein Haupttransformationstermin an den Tagen 3 und 4. Dabei war der Transformationserfolg mit 18,55 % Immunoblasten am Tag 4 deutlich geringer als bei Normalpatienten.

Die im Ansatz S 24 zu beobachtende Zunahme der kleinen Fraktion um 21 % zwischen Tag 4 und 7 bei gleichzeitiger Verminderung der Immunoblastenfraktion um 13 % war wahrscheinlich durch Retransformation bei günstigen Kulturbedingungen zu erklären. Die Differenz von 8 % ist dadurch bedingt, daß aus einem retransformierenden Blasten mehrere kleine T-Zellen entstanden.

Die Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten wies keine wesentlich größere Amplitude als 10 % auf. Diese geringe Dynamik sprach wie bei Normal- und CLL-Lymphozyten gegen eine deutlichere Beteiligung beider Fraktionen an der Blastopoese, wobei sich die große Fraktion noch träger verhielt als die mittlere.

Wie bei Normallymphozyten und CLL-Zellen waren geringfügige gegenläufige Bewegungen zwischen kleiner, mitt-

lerer und großer Fraktion durch das Auftreten eines geringen Prozentsatzes zu Blasten transformierender kleiner Lymphozyten in Form von "transitional cells" (61, 175) in der mittleren und großen Fraktion bedingt.

Der Abfall des relativen Pyknosenanteils zwischen Tag 3 und 4 erklärt sich durch Untergang von Pyknosen bei fehlendem Nachschub. Gleichzeitig ging ja die Majorität der Zellen in die Blastopoese ein. Der kontinuierliche Anstieg des prozentualen Anteils der Pyknosen zwischen Tag 5 und 7 dürfte durch natürliche Zellinvolution bei sich verschlechternden Kulturbedingungen zu späten Terminen bedingt gewesen sein.

Der hohe Markierungsindex der Immunoblasten am Tag 0 bedarf besonderer Diskussion. Wie schon bei Normal- und CLL-Lymphozyten beobachtet, handelte es sich bei diesen Zellen entweder um das Ergebnis einer Spontantransformation oder wahrscheinlicher um eine Population bereits zirkulierender, hochmarkierter großer Zellelemente mit blastoidem Charakter. Ihre hohe Markierungsintensität ist als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu bewerten (207).

Zum Tag 3 fiel der Blastenmarkierungsindex deutlich ab und näherte sich dem der kleinen Fraktion an. Im Rahmen der PHA-abhängigen Transformation kamen also wie bei Normalpatienten und der CLL in zunehmendem Maße nicht markierte kleine T-Zellen zum Umsatz. Dabei war der Anteil markierter Zellen am transformierenden Compartment größer als bei Normalpatienten aber kleiner als in CLL-Kulturen. Auch die Markierungsintensität dieser Zellen lag deutlich niedriger als bei den "Frühblasten".

Die Korrelation von Markierungsindexabfall und deutlicher Zunahme der Absolutzahl markierter Blasten erklärte sich durch die Zunahme der Transformation unter PHA-Wirkung zum Tag 3 und 4, wobei eben der Anteil nicht markierter Zellen am Umsatz stärker zunahm als der markierter.

Zu späten Terminen stieg der Blastenmarkierungsindex wieder an. Die Absolutzahl markierter Blasten war bei deutlicher Verminderung der Blastenfraktion höher als zu frühen Terminen. Auch die Markierungsintensität lag höher als zum Zeitpunkt der Haupttransformation. Im Rahmen der geringgradigen Spätblastopoese spielten also markierte T-Zellen wieder eine größere Rolle als bei der Haupttransformation.

Das Markierungsverhalten der mittleren und großen Fraktion zeigte weitgehende Analogie zu dem der Blastenfraktion, wobei gegenläufige Bewegungen für das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) sprachen. So fand sich korrelierend mit einem Indexabfall der großen Fraktion zwischen Tag 3 und 4 ein Anstieg des Blastenmarkierungsindex. Mit einem deutlichen Indexabfall der mittleren Lymphozyten zwischen Tag 4 und 5 korrelierte ein Anstieg dieses Parameters bei großen Lymphozyten und Immunoblasten.

Der Pyknosenmarkierungsindex blieb zwischen Tag 0 und 3 bei deutlichem Anstieg der markierten Pyknosen relativ konstant. Der relative Pyknosenanteil stieg in diesem Zeitraum deutlich an. Da dieser Anstieg wahrscheinlich durch eine Störung der Blastopoese bedingt war, sprach das Verhalten der Markierungsparameter dafür, daß von dieser Störung nicht markierte Zellen stärker betroffen waren als markierte.

Der weitere Anstieg des Pyknosenmarkierungsindex zwischen Tag 3 und 4 bei Konstanz der Absolutzahl markierter Pyknosen und gleichzeitiger Verminderung des relativen Pyknosenanteils war wahrscheinlich dadurch bedingt, daß markierte Pyknosen langsamer dem endgültigen Zelluntergang anheimfielen als nicht markierte. Deshalb fiel der Markierungsindex verzögert erst zum Tag 5 mit Abfall der Absolutzahl der markierten Zellen.

Der steile Wiederanstieg des Markierungsindex und der Absolutzahl der markierten Pyknosen bei relativ geringem Anstieg des prozentualen Anteils der Pyknosen an der Gesamtzellzahl zwischen Tag 5 und dem Kulturende war durch verstärkten Untergang markierter Zellen zu diesen späten Kulturzeitpunkten bedingt. Dabei spielte wahrscheinlich neben natürlicher Zellinvolution eine durch sich verschlechternde Kulturbedingungen verursachte Störung der unbedeutenden Spätblastopoesis eine Rolle, an der wie ausgeführt markierte kleine T-Zellen einen nicht unbeträchtlichen Anteil hatten.

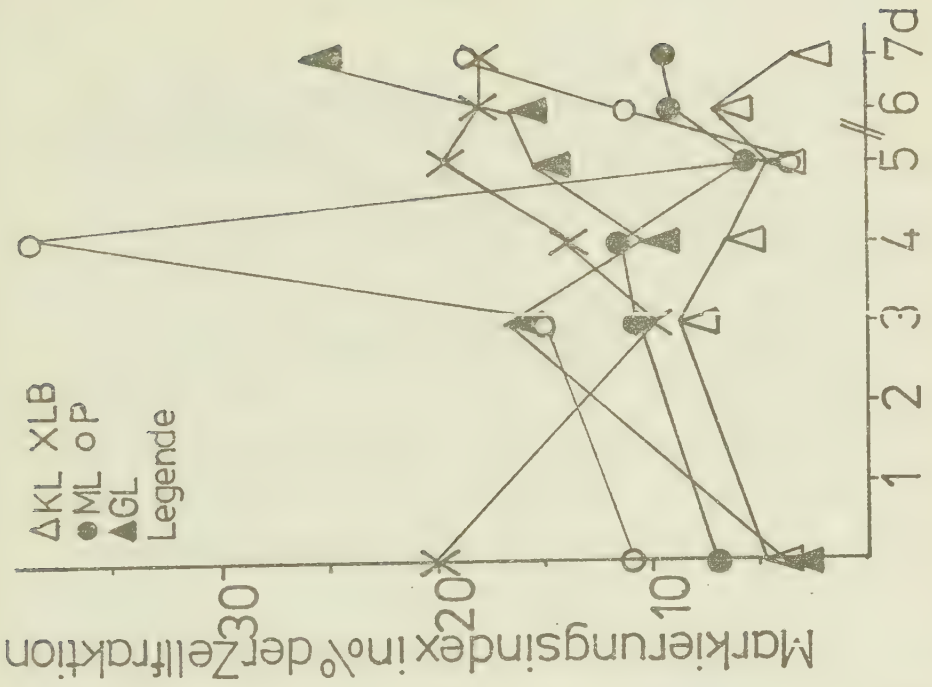
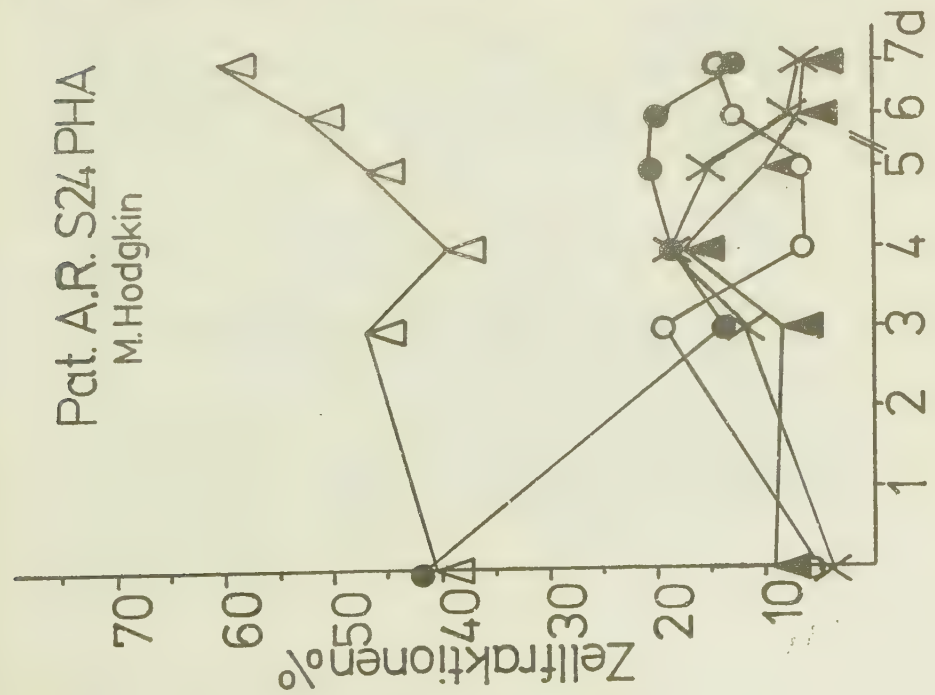


Tabelle I Pat. A.R. S 24 PHA Lymphogranulomatose
 Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4	5	6	7
KL=kleine Lymphozyten	58	30	50	29	40	26
ML=mittlere Lymphozyten	45	58	40	37	35	55
GL=große Lymphozyten	68	53	26	39	34	34
LB=Lympho- blasten	54	48	23	50	62	47
P=Pyknosen	10	15	14	12	15	19

Tabelle II Pat. A.R. S 24 PHA Lymphogranulomatose
 Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4	5	6	7
KL=kleine Lymphozyten	17	41	24	11	11	20
ML=mittlere Lymphozyten	29	15	24	12	18	12
GL=große Lymphozyten	4	13	17	15	11	14
LB=Lympho- blasten	8	9	26	30	13	14
P=Pyknosen	6	30	26	3	15	25

Tabelle III Pat. A.R. S 24 PHA Lymphogranulomatose
 Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4	5	6	7
Freie Zellen	37,88	12,30	12,51	10,49	14,15	8,53
Zellen in Agglutinaten	62,12	87,70	87,49	89,51	85,85	91,47

4.32 Patient H6.A.:

4.321 Zellbewegungen: (s. Graphiken A_w und A_{w_2}) Der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl fällt in beiden Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Kulturende kontinuierlich ab.

Der relative Anteil der mittleren Lymphozyten hält sich bei geringfügigen Schwankungen um 10 % im Kulturverlauf weitgehend konstant.

Analoges Verhalten zeigt der prozentuale Anteil der großen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl.

Der relative Immunoblastenanteil steigt in beiden Ansätzen zwischen Tag 0 und 4 deutlich an und fällt dann zum Kulturende wieder ab, wobei der Abfall in A_{w_2} langsamer erfolgt als im Ansatz A_w .

Der prozentuale Anteil der Pyknosen an der Gesamtzellzahl steigt in beiden Ansätzen zwischen Kulturbeginn und Kulturende kontinuierlich an, wobei der Anstieg im Ansatz A_w ab Tag 3, im Ansatz A_{w_2} ab Tag 4 besonders steil ist.

4.322 Markierungsverhalten: (s. Graphiken und Tabellen I und II A_w und A_{w_2}) Der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten steigt im Ansatz A_w zwischen Tag 0 und 2 leicht, zwischen Tag 2 und 7 deutlich an. Die Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten steigt im gleichen Ansatz zwischen Tag 0 und 3 steil an und bleibt dann konstant. Im Ansatz A_{w_2} fallen beide Parameter zwischen Tag 0 und 4 ab, steigen dann bis zum Tag 8 wieder an und fallen zum Tag 9 erneut. Die Markierungsintensität der kleinen Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

Im Ansatz A_w steigt der Markierungsindex der mittleren Lymphozyten zwischen Tag 0 und 2 an, fällt zum Tag 3 wieder ab und steigt zum Tag 7 erneut an. Die Absolutzahl der markierten Zellen verhält sich bis zum Tag 3 analog und bleibt dann bis zum Kulturende konstant. Im Ansatz A_{w_2} fallen beide Parameter zwischen Tag 0 und 4 ab und steigen zwischen Tag 4 und 7 wieder an, um zum Kulturende erneut abzufallen. Die Markierungsintensität bleibt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

Im Ansatz A_w steigt der Markierungsindex der großen Lymphozyten zwischen Tag 0 und 3 leicht, zwischen Tag 3 und 7 steil an. Die Absolutzahl der markierten Zellen steigt zwischen Tag 0 und 3 an, um zum Kulturende abzufallen. Im Ansatz A_{w_2} steigen beide Parameter zwischen Tag 0 und 1 an, fallen zum Tag 2 wieder ab, steigen zwischen Tag 2 und 7 wieder an, fallen zum Tag 8 ab, um zum Tag 9 noch einmal anzusteigen. Die Markierungsintensität steigt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf kontinuierlich an.

Im Ansatz A_w fällt der Markierungsindex der Immunoblasten zwischen Tag 0 und 2 deutlich ab und steigt dann zwischen Tag 3 und 7 wieder an. Die Absolutzahl der markierten Blasten bleibt zwischen Tag 0 und 3 relativ konstant und fällt dann zum Kulturende deutlich ab. Im Ansatz A_{w_2} steigen beide Parameter zwischen Tag 0 und 8 kontinuierlich an, besonders steil zwischen Tag 6 und 8, und fallen dann zwischen Tag 8 und 9 wieder ab. Die Markierungsintensität steigt in beiden Ansätzen kontinuierlich im Kulturverlauf.

Der Pyknosenmarkierungsindex steigt im Ansatz Aw zwischen Tag 0 und 3 deutlich an und fällt dann zum Kulturende ab. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen steigt bis zum Kulturende kontinuierlich an. Im Ansatz Aw₂ fällt der Markierungsindex zwischen Tag 0 und 4 ab, steigt zum Tag 6 erneut an und fällt dann zum Kulturende ab. Die Absolutzahl markierter Pyknosen steigt zum Tag 3 an, fällt zum Tag 4 ab und steigt zum Kulturende erneut. Der Pyknosenmarkierungsindex bleibt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf konstant.

4.324 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III Aw und Aw₂)
In beiden Ansätzen werden Normalpatienten vergleichbare Agglutinatprozentsätze leicht verzögert erreicht, bleiben dann im Kulturverlauf relativ konstant und vermindern sich deutlich erst wieder zu späten Terminen.

4.324 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungsverhaltens von Lymphogranulomatose-Lymphozyten unter PHA-Wirkung (Aw, Aw₂): Der Prozentsatz der in Zellagglutinaten befindlichen Lymphozyten erreichte zum Tag 1 (Aw₂) bzw. zum Tag 2 (Aw) Normallymphozyten vergleichbare Werte. Diese Werte fielen erst zu späten Terminen deutlich ab. Lymphogranulomatose-Lymphozyten sprachen also etwas verzögert in Normallymphozyten vergleichbarer Größenordnung auf PHA an. Ihre Vitalität in der PHA-stimulierten Kultur war nicht eingeschränkt.

Auch beim Patienten Hö.A. fielen in beiden Ansätzen die stärksten Gewinne der Blastenfraktion mit deutlichen Verlusten der kleinen Lymphozyten zusammen, was für einen direkten Übergang kleiner T-Zellen in Immunblasten sprach. Im Ansatz Aw nahm die Immunblastenfraktion zwischen Tag 0

und 3 um 15 % zu, die kleinen Lymphozyten nahmen um 20 % ab; im Ansatz Aw_2 verminderte sich die kleine Fraktion um 65 % zwischen Tag 0 und 4, die Immunoblastenfraktion nahm im gleichen Zeitraum um 27 % zu.

Die stärkste Blastenvermehrung erfolgte wie bei Normallymphozyten zwischen Tag 2 und 4. Der Transformationserfolg war mit 21,90 % in Aw am Tag 3 und mit 28,13 % in Aw_2 am Tag 4 deutlich besser als bei der chronischen Lymphadenose, allerdings immer noch geringer als bei Normalpatienten.

Die Trägheit der Bewegung der mittleren und großen Lymphozyten sprach gegen eine deutlichere Beteiligung beider Fraktionen an der Blastopoese. Geringe gegenläufige Bewegungen zwischen kleiner, mittlerer und großer Fraktion waren wohl durch das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) bedingt.

Der in beiden Ansätzen zum Zeitpunkt der Haupttransformation relativ hohe Pyknosenanteil erklärte sich durch eine Störung der Transformation, wobei viele Zellen ohne Transformation durch Involution zugrunde gingen. Der kontinuierliche Anstieg der Pyknosenfraktion zwischen Tag 4 und dem Kulturrende war vermutlich durch allgemeine Zellinvolution bei sich verschlechternden Kulturbedingungen verursacht.

Im Ansatz Aw fand sich am Tag 0 ein hoher Blastenmarkierungsindex, der in Aw_2 fehlte. Wie bereits mehrfach erwähnt, handelte es sich bei diesen Zellelementen sehr wahrscheinlich nicht um echte Blasten, sondern um eine Population bereits zirkulierender, hochmarkierter großer

Zellen mit blastoidem Charakter. Ihre hohe Markierungsintensität war Ausdruck raschen Umsatzverhaltens (207).

Zum Zeitpunkt der Haupttransformation war der Blastenmarkierungsindex deutlich niedriger. Im Rahmen der PHA-abhängigen zeitgerechten Transformation kamen in zunehmendem Maße nicht markierte kleine T-Zellen zum Umsatz. Der Anteil markierter Zellen am transformierenden Compartment war dabei größer als bei Normalpatienten.

Zum Kulturende stiegen in beiden Ansätzen der Markierungsindex und die Absolutzahl markierter Immunoblasten wieder deutlich an. Von den wenigen, zu späten Kulturzeitpunkten noch anzutreffenden Blasten waren auffallend viele markiert. Die gleichzeitige Zunahme der Markierungsintensität machte deutlich, daß zu späten Terminen vor allem markierte Zellen zur Transformation gekommen waren.

Das Markierungsverhalten der mittleren und großen Fraktion zeigte weitgehende Analogie zu dem der Blastenfraktion, wobei gegenläufige Bewegungen das Auftreten von "transitional cells" (61, 175) wahrscheinlich machten. So fand sich z.B. im Ansatz Aw₂ ein relativ hoher Markierungsindex der mittleren Fraktion am Tag 0, der bei gleichzeitigem Anstieg des Index der großen Lymphozyten zum Tag 1 fiel. Am Tag 2 kam es dann bei Abfall des Markierungsindex beider Fraktionen zu einem deutlichen Anstieg des Blastenmarkierungsindex. Zwischen Tag 7 und 8 fand sich erneut ein deutlicher Abfall des Markierungsindex und der Absolutzahl markierter mittlerer und großer Lymphozyten, während beide Parameter bei den Immunoblasten deutlich stiegen.

Der Abfall des Pyknosenmarkierungsindex in A_{W_2} zwischen Tag 0 und 4, bei Anstieg der Absolutzahl der markierten Pyknosen bis Tag 3 und Abfall zum Tag 4, zeigte, daß zu frühen Kulturterminen die Pyknosen bevorzugt aus der Blastopoesie stammten, daß zwischen Kulturbeginn und Haupttransformationstermin der Anteil nicht markierter Zellen an der Blastenbildung deutlich zunahm. Zwar nahm auch die Zahl markierter Zellen an der Blastopoesie zu, doch in viel geringerem Ausmaß als die nicht markierter.

Der Wiederanstieg beider Parameter zwischen Tag 4 und 5 machte deutlich, daß zu späten Terminen der Anteil markierter Zellen an der Blastopoesie wieder zunahm.

Zwischen Tag 6 und 9 fiel bei Konstanz der Absolutzahl markierter Pyknosen der Pyknosenmarkierungsindex kontinuierlich ab. Vom generalisierten Zelluntergang zu späten Terminen waren also nicht markierte Zellen in stärkerem Maße betroffen als markierte. Dies wurde besonders deutlich im Ansatz A_W , wo bei steilem Anstieg der Markierungsindices aller übrigen Fraktionen zum Kulturende der Pyknosenmarkierungsindex bei deutlicher Zunahme der Absolutzahl markierter Pyknosen steil abfiel.

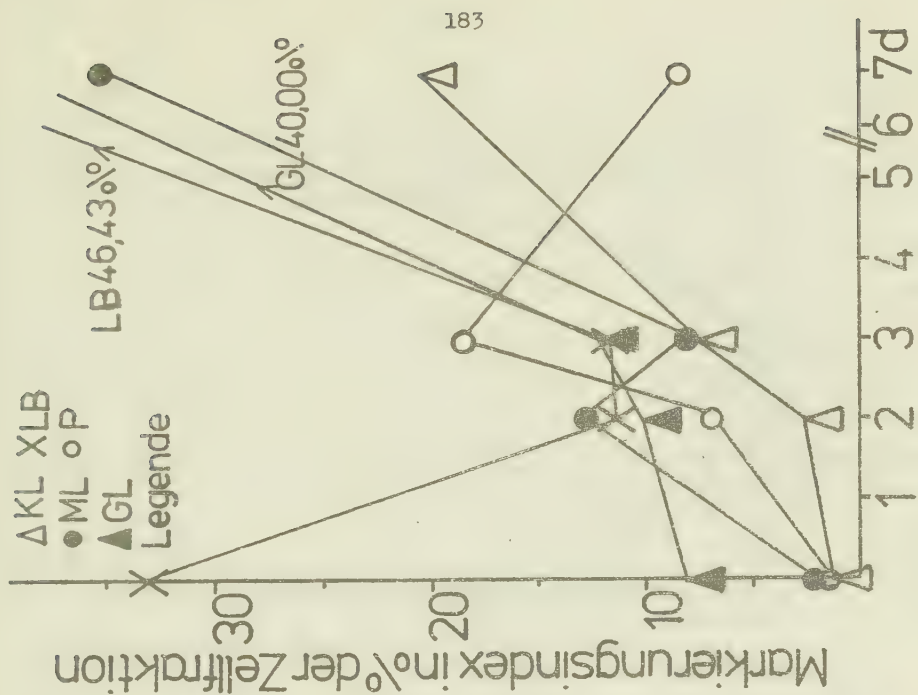
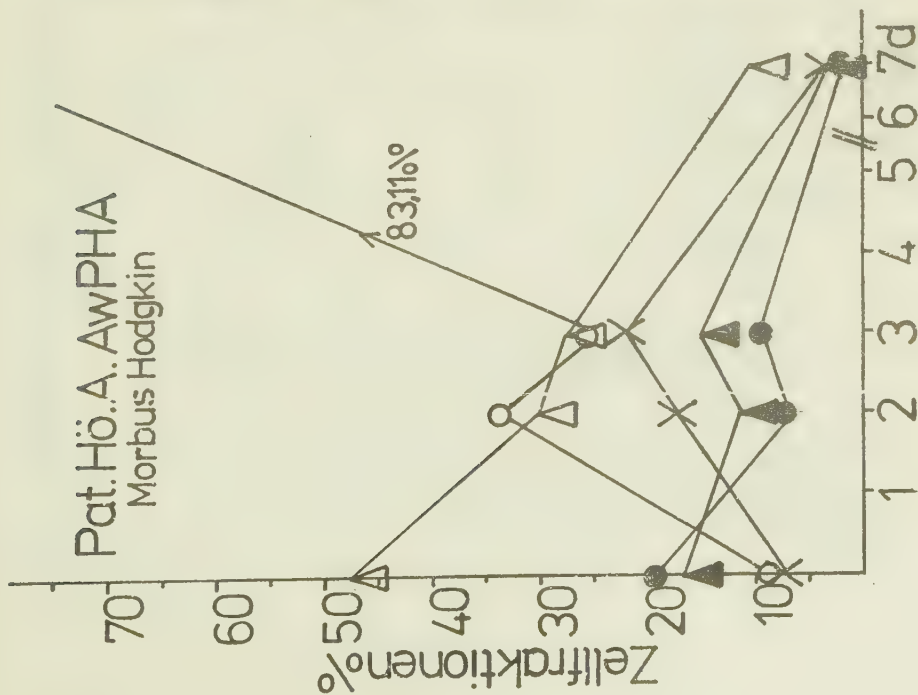


Tabelle I Pat. H6.A. Aw PHA Lymphogranulomatose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	2	3	7
KL=kleine Lymphozyten	26	19	29	23
ML=mittlere Lymphozyten	37	21	36	33
GL=große Lymphozyten	26	48	63	60
LB=Lympho- blasten	43	57	83	74
P=Pyknosen	11	13	14	15

Tabelle II Pat. H6.A. Aw PHA Lymphogranulomatose

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	2	3	7
KL=kleine Lymphozyten	5	11	20	21
ML=mittlere Lymphozyten	6	10	11	7
GL=große Lymphozyten	13	11	18	9
LB=Lympho- blasten	20	20	26	10
P=Pyknosen	2	24	48	70

Tabelle III Pat. H6.A. Aw PHA Lymphogranulomatose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	2	3	7
Freie Zellen	19,66	5,91	6,05	37,11
Zellen in Agglutinaten	80,34	94,09	93,95	62,89

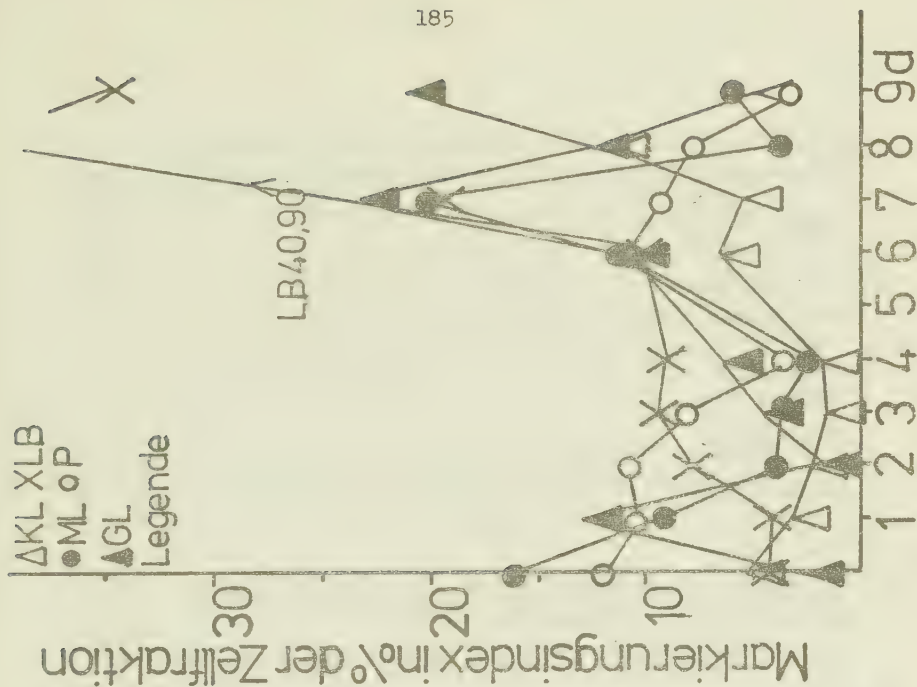
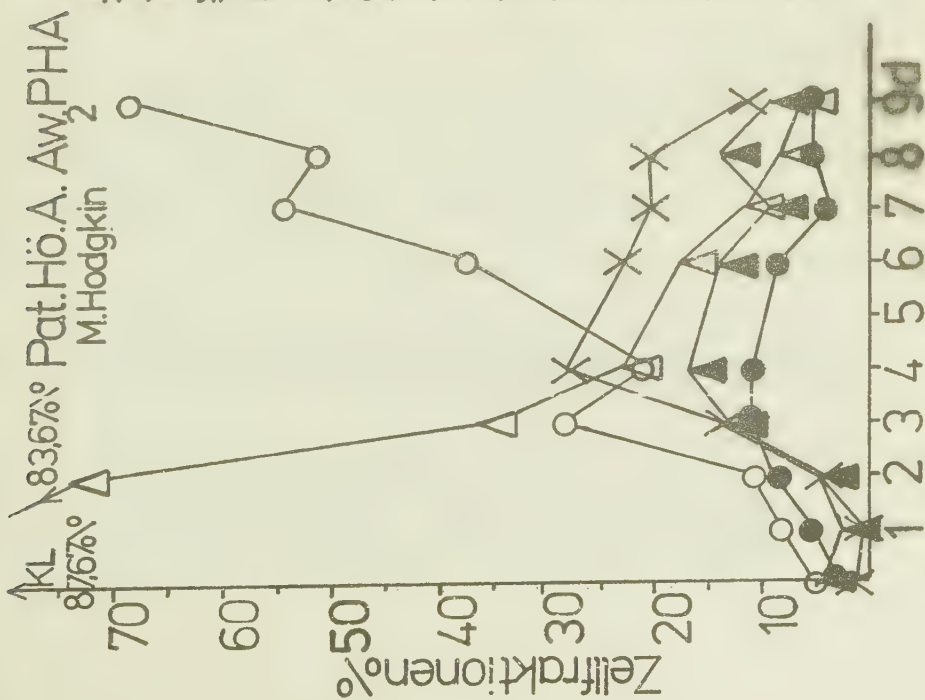


Tabelle I Pat. H6.A. Aw₂ PHA Lymphogranulomatose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	1	2	3	4	6	7	8	9
KL=kleine Lymphozyten	15	15	16	19	20	21	31	24	23
ML=mittlere Lymphozyten	20	21	16	34	28	36	31	25	29
GL=große Lymphozyten	26	24	24	56	28	58	51	37	72
LB=Lympho-blasten	28	29	46	70	36	115	59	61	101
P=Pyknosen	10	11	12	15	11	16	15	16	12

Tabelle II Pat. H6.A. Aw₂ PHA Lymphogranulomatose

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	1	2	3	4	6	7	8	9
KL=kleine Lymphozyten	4	6	1	5	4	10	5	5	3
ML=mittlere Lymphozyten	5	5	4	4	3	10	9	2	3
GL=große Lymphozyten	1	2	1	5	11	14	22	17	18
LB=Lympho-blasten	1	3	2	11	26	23	40	69	39
P=Pyknosen	6	9	11	23	8	42	51	41	43

Tabelle III Pat. H6.A. Aw₂ PHA Lymphogranulomatose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	1	2	3	4	6	7	8	9
Freie Zellen	41,67	0,22	3,57	4,51	19,08	15,76	26,03	39,10	37,90
Zellen in Agglutinaten	58,33	99,78	96,43	95,49	80,92	84,24	73,97	60,90	62,10

4.33 Patient M.F.:

4.331 Zellbewegungen: (s.Graphiken S 35 und S 37) In S 35 und S 37 fällt der prozentuale Anteil der kleinen Lymphozyten zwischen Tag 0 und 4 kontinuierlich ab. In S 37 setzt sich dieser Abfall zwischen Tag 4 und 7 mit zunehmender Steilheit fort, während in S 35 zwischen Tag 4 und 5 ein deutlicher Wiederanstieg des relativen Anteils der kleinen Lymphozyten erfolgt.

Der relative Anteil der mittleren Lymphozyten hält sich in beiden Ansätzen bei geringfügigen Schwankungen um 10 % im Kulturverlauf weitgehend konstant.

Analoges Verhalten zeigt der prozentuale Anteil der großen Lymphozyten an der Gesamtzellzahl, wobei die Schwankungen mit 5 % noch geringer sind als bei der mittleren Fraktion.

Der prozentuale Anteil der Immunoblasten steigt in S 35 zwischen Tag 0 und 3 an und fällt dann zum Kulturende wieder ab, während sich der Anstieg in S 37 bis zum Tag 4 fortsetzt und der relative Immunoblastenanteil erst dann bis zum Kulturende kontinuierlich abfällt.

Der relative Pyknosenanteil steigt in beiden Ansätzen zwischen Tag 0 und 4 an und bleibt dann in S 35 bis zum Kulturende konstant, während sich sein Anstieg in S 37 zwischen Tag 4 und 7 mit großer Steilheit fortsetzt.

4.332 Markierungsverhalten: (s.Graphiken und Tabellen I und II S 35 und S 37) Markierungsindex, Markierungintensität und Absolutzahl markierter kleiner Lymphozyten bleiben in beiden Ansätzen im Kulturverlauf weitgehend konstant.

Markierungsindex, Markierungsintensität und Absolutzahl der markierten mittleren Lymphozyten fallen in beiden Ansätzen im Kulturverlauf kontinuierlich ab, besonders steil zwischen Tag 3 und 4.

Markierungsindex, Markierungsintensität und Absolutzahl der markierten großen Lymphozyten fallen in Ansatz S 47 im Kulturverlauf kontinuierlich ab. Im Ansatz S 35 dagegen kommt es bei Abfall der Absolutzahl der markierten Zellen zwischen Tag 0 und 3 zu einem Anstieg des Markierungsindex der großen Lymphozyten. Im Ansatz S 35 findet sich auch eine hohe Markierungsintensität der großen Lymphozyten am Tag 0.

Markierungsindex, Markierungsintensität und Absolutzahl der markierten Immunoblasten fallen in beiden Ansätzen im Kulturverlauf kontinuierlich ab. In beiden Ansätzen ist außerdem die Markierungsintensität am Tag 0 höher als zu den späten Terminen.

Der Pyknosenmarkierungsindex steigt in beiden Ansätzen zwischen Tag 0 und 3 an und fällt dann in S 37 zum Kulturende ab. In S 35 kommt es nach Abfall zwischen Tag 3 und 4 zu einem Wiederanstieg zum Tag 6. Die Absolutzahl der markierten Pyknosen steigt in beiden Ansätzen zum Tag 3 an, fällt dann zum Tag 4 wieder ab und steigt kontinuierlich zum Kulturende erneut an. Die Markierungsintensität der Pyknosen bleibt in beiden Ansätzen im Kulturverlauf relativ konstant.

4.333 Agglutinationseffekt: (s. Tabellen III S 35 und S 37) In beiden Ansätzen sind bereits am Tag 0 Normalpatienten vergleichbare Agglutinatprozentsätze erreicht, die im Kulturverlauf weitgehend konstant bleiben.

4.354 Diskussion der Zellbewegungen und des Markierungs-
verhaltens von Lymphogranulomatose-Lymphozyten unter
PHA-Wirkung (S 35, S 37): Wie in Normalkulturen waren
 bereits am Tag 0 hohe Agglutinatprozentsätze erreicht,
 die im Kulturverlauf konstant blieben. Dies sprach für
 ein regelrechtes Ansprechen der Lymphogranulomatose-Lympho-
 zyten auf PHA und für ungestörte Vitalbedingungen unter
 der Wirkung dieses Antigens.

In beiden Ansätzen fielen die stärksten Blastengewinne
 mit den stärksten Verlusten der kleinen Fraktion zusam-
 men. Mit 17,00 % am Tag 3 in S 35 und mit 25,59 % am Tag
 4 in S 37 lagen die Transformationserfolge unter den Wer-
 ten von Normallymphozyten. Die stärkste Blastenvermehrung
 erfolgte wie bei Normalpatienten an den Tagen 3 und 4.

Die deutliche Zunahme der kleinen Lymphozyten in S 35
 zwischen Tag 4 und 6 bei gleichzeitiger Verminderung
 der Blastenfraktion war vermutlich das Ergebnis einer
 Retransformation unter günstigen Kulturbedingungen.

Die Trägheit der Bewegungen der mittleren und großen
 Lymphozyten sprach gegen eine deutlichere Beteiligung
 beider Fraktionen an der Blastopoese. Geringfügige gegen-
 läufige Bewegungen zwischen kleiner, mittlerer und großer
 Fraktion waren wohl durch das Auftreten von "transitional
 cells" (61, 175) bedingt.

Der in beiden Ansätzen zum Zeitpunkt der Haupttransfor-
 mation relativ hohe Pyknosenanteil erklärte sich wohl
 durch eine Störung der Transformation, wobei es zur Zell-
 involution ohne Transformation kam. Während die relative
 Konstanz des prozentualen Anteils der Pyknosen an der Ge-

samtzellzahl zwischen Tag 4 und 6 in S 35 Ausdruck guter Kulturverhältnisse war, sprach der steile Anstieg des relativen Pyknosenanteils in S 37 zwischen Tag 4 und 7 bei Verminderung aller übrigen Zellfraktionen für generalisierten Zelluntergang bei sich verschlechternden Kulturbedingungen zu späten Terminen.

In beiden Ansätzen fand sich am Tag 0 ein Compartment großer Zellen mit hohem Markierungsindex und hoher Markierungsintensität im Sinne einer Population zirkulierender blastoider Zellen, wie es auch bereits in den vorangehenden Ansätzen beobachtet wurde.

Zum Zeitpunkt der Haupttransformation war der Blastenmarkierungsindex deutlich niedriger als in früheren Fällen. Die Zahl nicht markierter kleiner T-Zellen an der Transformation hatte hier also deutlich zugenommen.

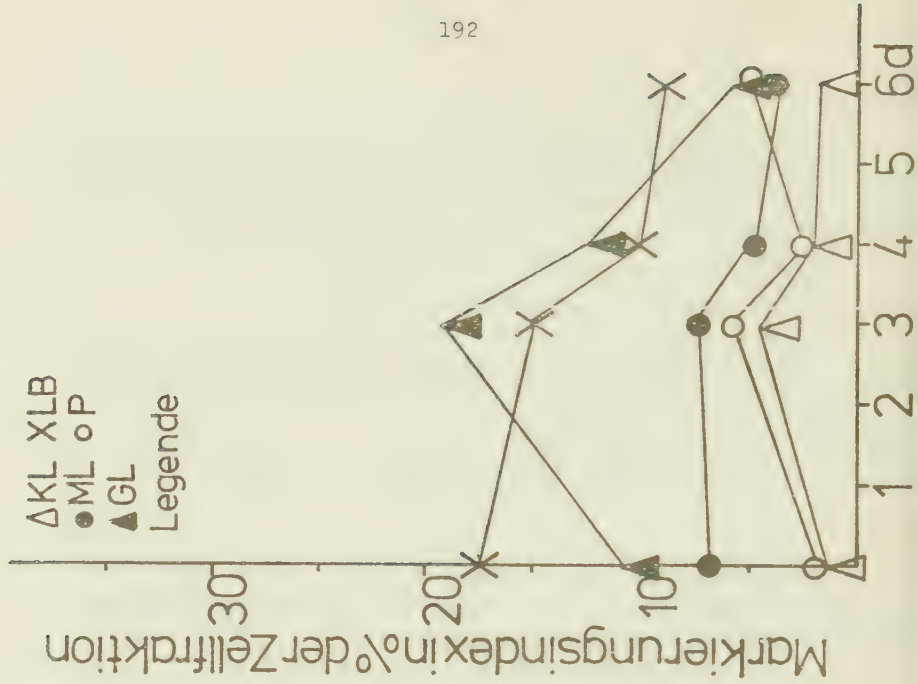
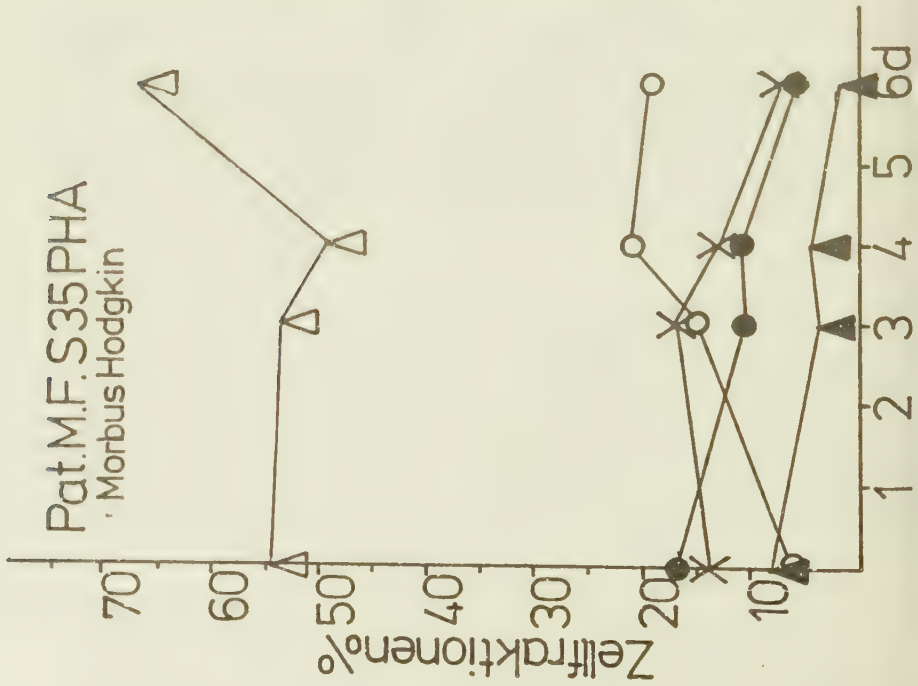
Während in S 35 der Blastenmarkierungsindex kontinuierlich zum Kulturende abfiel, war bei geringgradiger Blastopoese zwischen Tag 6 und 7 in S 37 ein leichter Wiederanstieg dieses Parameters zu beobachten. Markierte Zellen waren also bei der geringgradigen Transformation zu späten Terminen wieder stärker vertreten als zum Zeitpunkt der Haupttransformation.

Das Markierungsverhalten der mittleren und großen Fraktion zeigte weitgehende Analogie zu dem der Immunoblasten, was bei der geringen Eigendynamik beider Zellfraktionen für das Auftreten von kleinen Lymphozyten in Form von "transitional cells" (61, 175) in beiden morphologischen Compartmenten bei der Blastopoese sprach.

Der Anstieg des Pyknosenmarkierungsindex und der Absolutzahl markierter Pyknosen zwischen Tag 0 und 3 in beiden Ansätzen entsprach starkem Zelluntergang markierter Elemente im Rahmen der Haupttransformation.

Der kontinuierliche Abfall zu späten Terminen war Ausdruck starken Zelluntergangs durch sich verschlechternde Kulturbedingungen, wobei nicht markierte Zellen stärker betroffen waren als markierte. Das wurde besonders deutlich durch die Korrelation von Abfall des Markierungsindex mit Anstieg der Absolutzahl der markierten Pyknosen.

Der Wiederanstieg des Pyknosenmarkierungsindex in S 35 zwischen Tag 4 und 6 war eventuell, da ein deutlicher Pyknosenanstieg fehlt, Ergebnis der Retransformation, wobei einige kleine Lymphozyten sofort involvierten. Wahrscheinlicher handelte es sich allerdings um Zelluntergang im Rahmen einer geringen Spättransformation, an der ja wie beschrieben markierte Zellen in stärkerem Ausmaß beteiligt waren. Bei fehlendem deutlichem Pyknosenanstieg durch generalisierten Zelluntergang, der nicht markierte Zellen stärker betroffen hätte, mußte dies zum Anstieg des Pyknosenmarkierungsindex führen.



ΔKL XLB
●ML oP
▲GL
Legende

Tabelle I Pat. M.F. S 35 PHA Lymphogranulomatose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4	6
KL=kleine Lymphozyten	32	31	20	23
ML=mittlere Lymphozyten	60	36	25	34
GL=große Lymphozyten	83	42	42	36
LB=Lympho- blasten	124	63	53	46
P=Pyknosen	8	11	10	13

Tabelle II Pat. M.F. S 35 PHA Lymphogranulomatose

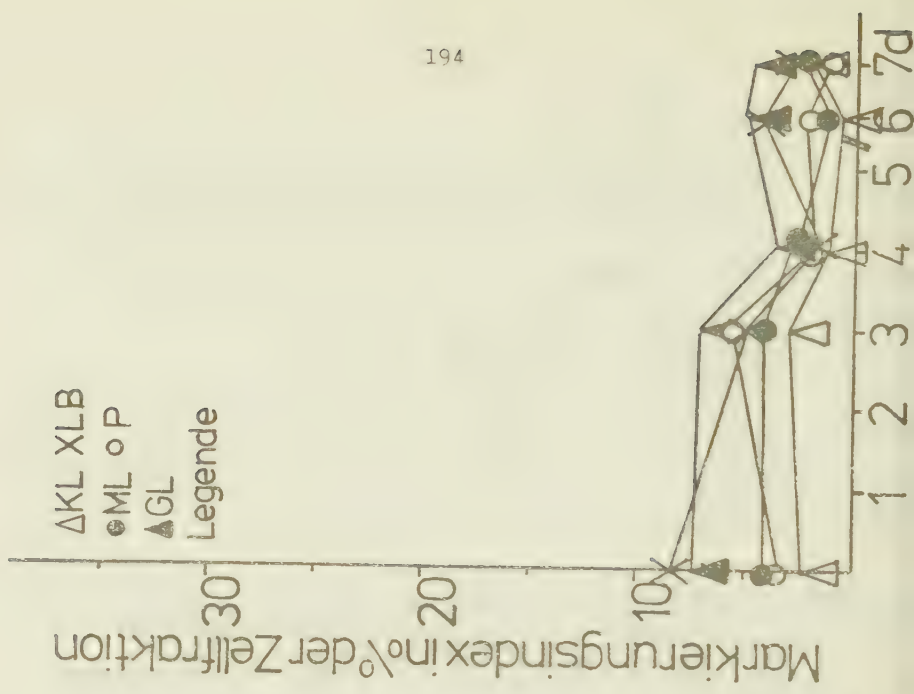
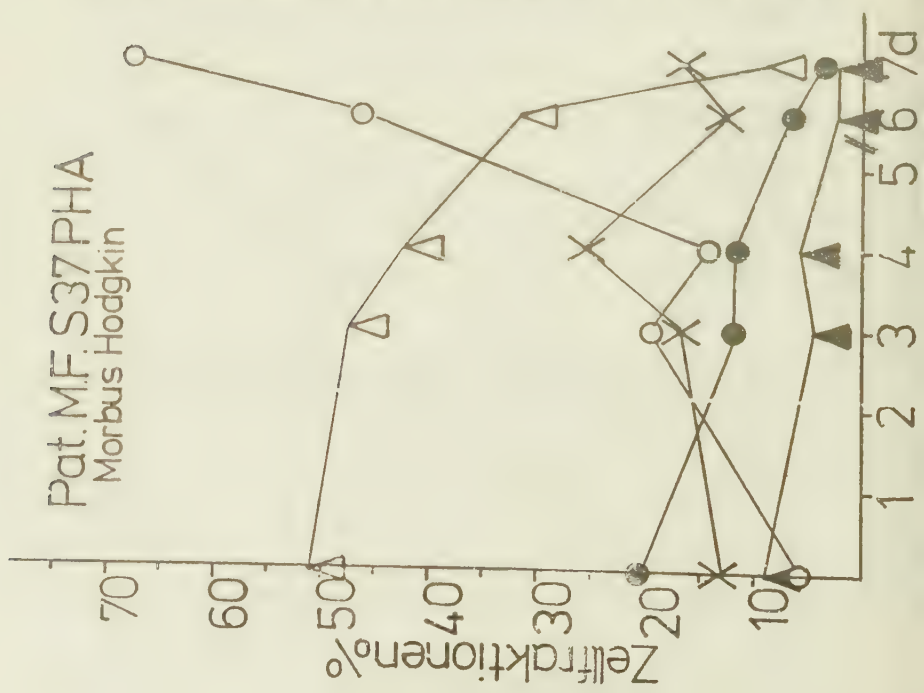
Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4	6
KL=kleine Lymphozyten	7	14	11	12
ML=mittlere Lymphozyten	12	8	5	3
GL=große Lymphozyten	9	7	5	1
LB=Lympho- blasten	25	26	15	8
P=Pyknosen	1	9	5	10

Tabelle III Pat. M.F. S 35 PHA Lymphogranulomatose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4	6
Freie Zellen	5,29	3,62	2,46	0,96
Zellen in Agglutinaten.	94,71	96,38	97,54	99,04



ΔKL XLB
●ML o P
▲AGL
Legende

Tabelle I Pat. M.F. S 37 PHA Lymphogranulomatose

Markierungsintensität (Mittlere Kornzahl/mean-grain-count)

Tage	0	3	4	6	7
KL=kleine Lymphozyten	19	26	16	18	12
ML=mittlere Lymphozyten	25	29	18	14	15
GL=große Lymphozyten	30	23	28	31	17
LB=Lympho- blasten	54	38	46	22	38
P=Pyknosen	8	11	12	10	12

Tabelle II Pat. M.F. S 37 PHA Lymphogranulomatose

Markierte Zellen/1000 Kulturzellen

Tage	0	3	4	6	7
KL=kleine Lymphozyten	12	15	5	3	2
ML=mittlere Lymphozyten	8	5	3	1	1
GL=große Lymphozyten	7	3	2	1	1
LB=Lympho- blasten	11	8	5	5	5
P=Pyknosen	2	11	3	8	12

Tabelle III Pat. M.F. 37 PHA Lymphogranulomatose

Zellverteilung in der Kultur (%)

Tage	0	3	4	6	7
Freie Zellen	10,74	0,97	3,83	7,39	7,76
Zellen in Agglutinaten	89,26	99,03	96,17	92,61	92,24

4.4 Lymphogranulomatose-Lymphozyten sprechen wie Normallympho-

zyten frühzeitig, gleichmäßig und ohne wesentliche Störung ihrer Vitalität auf PHA an.

Vorzugsweise kleine Lymphozyten setzen sich unter Wirkung dieses Antigens zu Immunoblasten um. Die Haupttransformation erfolgt wie bei Normallymphozyten am 3. und 4. Kulturtag. Das Transformationsergebnis ist deutlich schlechter als in Normalansätzen, aber im Schnitt besser als bei CLL-Lymphozyten.

Hochmarkierte Zellen setzen sich früher als schwächer und nicht markierte T-Zellen zu Immunoblasten um. Zum Zeitpunkt der Haupttransformation ist der Anteil markierter Zellen am transformierenden Compartment größer als bei Normallymphozyten aber deutlich geringer als in CLL-Ansätzen. Im Rahmen einer unbedeutenden Spättransformation nimmt der Anteil markierter T-Zellen am Umsatz wieder etwas zu.

Es finden sich drei Blastenfraktionen. Die erste, zu frühen Terminen auftretende entspricht eventuell dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher handelt es sich bei diesen Zellen aber nicht um echte Immunoblasten, sondern um eine Fraktion zirkulierender Zellen von Blastengröße mit in vivo erworbener hoher Markierungsintensität, was als Ausdruck raschen Umsatzverhaltens zu werten ist. Diese Fraktion der "Frühblasten" macht zu Kulturbeginn wie bei Normal- und CLL-Patienten maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus. Ihr Markierungsindex liegt hoch über dem der kleinen Lymphozyten.

Die zweite Fraktion entstammt unter PHA-Einfluß etwa von der 72. h an transformierenden T-Zellen und erreicht um den 3. - 4. Tag 18 - 25 %igen Anteil an der Kulturzellzahl. Sie leitet sich von kleinen Lymphozyten mit durchschnittlichem Markierungs- und Umsatzverhalten ab.

Die dritte Fraktion findet sich zu späten Kulturterminen. Sie macht maximal 10 % der Gesamtzellzahl aus. Markierte Zellen sind hier wieder stärker vertreten als in der Fraktion zwei. Auch die Markierungsintensität nimmt zu.

Mittlere und große Lymphozyten beteiligen sich kaum an der Blastopoese. Die große Fraktion verhält sich dabei träger als die mittlere. Ein unbedeutender Prozentsatz kleiner Lymphozyten erscheint in Form von "transitional cells" (61, 175) auf dem Weg der Blastopoese in beiden Fraktionen.

Die Mehrzahl der Pyknosen bis zum Tag 4 stammt aus der Blastopoese. Der Zelluntergang erfolgt über Involution bei nicht erfolgreicher Transformation. Zu späten Kulturterminen nimmt der Pyknosenanteil auf der Basis generalisierten Zelluntergangs deutlich zu.

4.4 Vergleich der Lymphozytenkinetik bei Normalpatienten, Chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose:

Normallymphozyten reagieren schon sehr frühzeitig auf PHA. Bereits am Tag 0 findet sich ein hoher Agglutinatprozentsatz. Ein auch zellmorphologisch faßbarer PHA-Effekt zeigt sich in Form starker Blastenbildung am Tag 3 - 4.

CLL-Lymphozyten sprechen dagegen verzögert auf PHA an. Ein Normallymphozyten vergleichbarer Agglutinatprozent-

satz findet sich so erst am Tag 2 - 3. Auch die Blastenbildung erfolgt verzögert. Sie beginnt zwar ebenfalls am Tag 3, wobei an den Tagen 3 und 4 ein erster Transformationsgipfel auftritt, verläuft dann allerdings tardiert bis zum Kulturende weiter, und es findet sich in der Regel zwischen dem 6. und 8. Tag ein zweiter Spättransformationsgipfel.

Die Hodgkin-Lymphozyten verhalten sich unter PHA-Wirkung weitgehend wie Normallymphozyten. Spätestens am Tag 1 finden sich hohe Agglutinatprozentsätze. Die Blastopoese erfolgt im wesentlichen an den Tagen 3 und 4. Zu einer Spättransformation kommt es nicht.

Bei allen drei Patientengruppen setzen sich nahezu ausschließlich kleine Lymphozyten unter PHA-Wirkung zu Immunblasten um. Daneben gehen in geringem Umfang im Sinne eines "self-feeding" (113) Blasten aus Blasten hervor. Hochmarkierte Zellen setzen sich früher als schwächer bzw. nicht markierte Zellen zu Immunblasten um.

In Normalkulturen setzen sich zum Zeitpunkt der Haupttransformation markierte und nicht markierte kleine T-Zellen relativ unselektionierte zu Blasten um. Bei Lymphogranulomatose-Patienten ist der Anteil markierter T-Zellen am transformierenden Compartment deutlich größer als bei Normalpatienten. Am größten ist allerdings der Anteil markierter Zellen am Umsatz bei der chronischen Lymphadenose.

Es finden sich drei Blastenfraktionen. Die erste zu frühen Terminen auftretende entspricht möglicherweise

dem Ergebnis einer Spontantransformation. Wahrscheinlicher allerdings handelt es sich bei diesen Zellelementen nicht um echte Immunoblasten, sondern um bereits zirkulierende hochmarkierte Zellen von Blastengröße. Ihre hohe Markierungsintensität ist wohl Ausdruck raschen Umsatzverhaltens. Diese "Frühblasten" machen bei allen Patientengruppen zu Kulturbeginn zwischen 8 und 10 % der Gesamtzellzahl aus.

Die zweite Blastenfraction entstammt unter PHA-Einfluß etwa von der 72. h an transformierenden T-Zellen. Sie erreicht um den 3. - 4. Tag bei Normalpatienten 30 - 40 %igen, bei Hodgkin-Patienten 18 - 25 %igen und bei CLL-Patienten 15 - 20 %igen Anteil an der Gesamtzellzahl. Der Transformationserfolg ist damit bei Normallymphozyten am größten. Das Umsatzergebnis ist bei Lymphogranulomatose-Lymphozyten um die Hälfte niedriger und bei CLL-Lymphozyten noch schlechter. Wie ausgeführt und am Vergleich zwischen den Markierungsindices der kleinen Fraction und der Blastenfraction erkennbar, ist der Anteil markierter T-Zellen am transformierenden Compartment bei der CLL am größten und bei der Lymphogranulomatose deutlich höher als bei Normalpatienten, während sich bei Normallymphozyten zwischen der 72. und der 96. h markierte wie unmarkierte T-Zellen relativ unselektioniert zu Blasten umsetzen.

Die dritte Blastenfraction findet sich zu späten Kulturterminen. Besonders deutlich tritt sie in CLL-Ansätzen auf, was wohl dadurch bedingt ist, daß zusätzlich zu den ohnehin zu späten Terminen zur Transformation kommenden kleinen Lymphozyten im Sinne der Grundkrankheit in ihrer PHA-Ansprechbarkeit beeinträchtigte kleine T-Zellen in größerer Zahl sich verzögert umsetzen. Außerdem kommt wie beschrieben durch natürlichen Zelluntergang und

damit Verminderung der B-Zellzahl zu späten Kulturterminen aus stereometrischen Gründen der von stimulierten T-Zellen abgesonderte mitoseinduzierende Faktor MIF besser zur Wirkung. Markierungsindex und Markierungsintensität dieser dritten Blastenfraktion liegen in der Regel höher als die gleichen Parameter der Fraktion zwei. Zu späten Terminen nimmt also der Anteil markierter T-Zellen am transformierenden Compartment deutlich zu, am stärksten bei der CLL.

Bei der CLL ist der Erfolg der Blastopoese der Malignität des B-zelleukämischen Prozesses, dessen unmittelbar klinisch faßbares pathologisch-anatomisches Substrat die periphere Lymphozytose ist, umgekehrt proportional. Bei Zunahme der Malignität und damit der peripheren Lymphozytose verschiebt sich der Umsatz zunächst in Richtung verzögerter Transformation, da die Zahl der nicht geschädigten T-Zellen abnimmt, schließlich kommt es korrelierend mit einer Verminderung überhaupt noch umsatzfähiger T-Zellen zu einer absoluten Abnahme des relativen Blastenanteils.

Hodgkin-Lymphozyten zeigen wie die Normallymphozyten die Hauptblastenbildung an den Tagen 3 und 4. Dies spricht gegen größere Defekte der sich umsetzenden Zellen. Der Erfolg der Blastopoese ist allerdings um 50 % geringer als bei Normallymphozyten und nur wenig besser als bei CLL-T-Zellen. Dies ist wohl auf eine Verminderung der T-Zellzahl im Rahmen der allgemeinen Lymphopenie beim Morbus Hodgkin zurückzuführen.

Mittlere und große Lymphozyten beteiligen sich bei allen drei Patientengruppen allenfalls in geringem Ausmaß an

der Blastopoese, wobei sich die große Fraktion noch träger verhält als die mittlere. Ein unbedeutender Prozentsatz von zu Blasten sich umsetzenden T-Zellen erscheint allerdings in Form von "transitional cells" (61, 175) in diesen beiden Fraktionen. Unseren Beobachtungen gemäß treten diese Durchgangsformen bei der Lymphogranulomatose in stärkerem Maß auf als bei Normalpatienten, bei der CLL wiederum in noch größerer Menge als bei der Lymphogranulomatose, besonders deutlich im Rahmen der verzögerten Transformation.

Bis zum Tag 4 stammt die Mehrzahl der Pyknosen bei allen drei Patientengruppen aus der Blastopoese. Der Zelluntergang erfolgt vermutlich über Involution bei nicht erfolgreicher Transformation. Etwa ab Tag 5 setzt ein generalisierter, durch sich verschlechternde Kulturbedingungen verursachter Zelluntergang ein, von dem nicht markierte Zellen relativ stärker betroffen sind als markierte.

4.5 Das T-Zellcompartment:

Unsere Untersuchungen gestatten es, die Größe des blastenbildenden T-Zellcompartiments bei den einzelnen Patienten und den Patientengruppen zu errechnen.

Da wie ausgeführt unter PHA-Wirkung in vitro sich nur T-Zellen zu Blasten umsetzen, sind alle in den Kulturen entstandenen Blasten T-Zellen und können zur Berechnung der Compartimentsgröße herangezogen werden.

Die meisten Immunblasten treten in allen Fällen zum Zeitpunkt der Haupttransformation an den Tagen 3 und 4 auf. Im Rahmen der Haupttransformation ist derjenige

Termin für die Errechnung der Größe des T-Zellcompartiments am geeignetsten, an dem der relative Immunoblastenanteil am höchsten, die Demaskierung der T-Zellen durch PHA-abhängige Transformation also am weitesten fortgeschritten ist. Das ist von Fall zu Fall verschieden entweder der Tag 3 bzw. der Tag 4.

Die übrigen Zellfraktionen können nicht zur Berechnung der Größe des T-Zellcompartiments herangezogen werden.

Da mittlere und große Lymphozyten sich allenfalls in geringem Ausmaß an der Blastopoese beteiligen, weisen sie sich in der großen Mehrzahl als B-Zellen aus. Die Zahl der T-Zellen, die in Form von "transitional cells" (61, 175) im Rahmen der Blastopoese in diesen beiden Fraktionen auftreten, ist sicherlich gering, ihre Abgrenzung von den B-Zellen aufgrund fehlender morphologischer Differenzen nicht möglich.

Die Mehrzahl der Pyknosen stammt aus unseren Untersuchungen gemäß bis zum Tag 4 aus der Blastopoese. Es handelt sich also um T-Zellen, die bei nicht erfolgreichem Umsatz über Involution zugrundegehen. Bei einem wenn auch kleinen Teil der Frühpyknosen handelt es sich aber sicher um untergehende B-Zellen. Da eine morphologische Differenzierung nicht möglich ist, muß auch die Pyknosenfraktion bei der Berechnung vernachlässigt werden.

Ähnlich sind die Verhältnisse bei der kleinen Fraktion. Die Immunoblasten stammen fast ausschließlich von kleinen Lymphozyten ab. Die kleine Fraktion ist also das T-Zellreservoir. Sicher haben sich zu den Haupttransformationsterminen auch keineswegs alle T-Zellen zu Blasten

umgesetzt. Aber neben kleinen T-Zellen gibt es sehr wahrscheinlich auch kleine B-Zellen. Eine morphologische Differenzierung ist wie ausgeführt wegen fehlender anatomischer Unterschiede nicht möglich. Eine Aufschlüsselung anhand der Markierung verbietet sich. Zwar sind einerseits, wie die Untersuchungen zeigen, die meisten hochmarkierten kleinen Lymphozyten T-Zellen, andererseits gibt es aber sicher auch hochmarkierte kleine B-Zellen. Die kleine Fraktion kann also rechnerisch ebenfalls nicht berücksichtigt werden.

Da also nur die Immunoblasten als T-Zellen ausgewiesen sind, können wir aufgrund unserer Untersuchungen lediglich eine untere Grenze des T-Zellcompartiments stabil bestimmen. Trotzdem sind diese Berechnungen für die Beurteilung des Umsatzverhaltens der blastenbildenden Zellfraktion und damit für die Beurteilung der Qualität der zellulären Immunität bei den verschiedenen Patientengruppen sehr wichtig.

4.51 Das T-Zellcompartiment bei Normalpatienten:

Patientin He.A. S 33 PHA:

24,11 % Immunoblasten = 24,11 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 7100 Leukozyten/mm³ 33 %, also 2343 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren bei dieser Patientin also mindestens 565 T-Lymphozyten vorhanden.

Patientin B.R. S 56 PHA:

43,06 % Immunoblasten = 43,06 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 7000 Leukozyten/mm³ 32 %, also 2240 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes

waren bei dieser Patientin also mindestens 965 T-Lymphozyten vorhanden.

Patientin B.R. S 57 PHA:

29,09 % Immunoblasten = 29,09 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 7000 Leukozyten/mm³ 32 %, also 2240 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 652 T-Lymphozyten vorhanden.

Patientin B.R. S 59 PHA:

36,23 % Immunoblasten = 36,23 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 7000 Leukozyten/mm³ 32 %, also 2240 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 812 T-Lymphozyten vorhanden.

Unseren Untersuchungen gemäß sind also bei Normalpatienten im Mittel wenigstens 33 % der Lymphozyten T-Zellen. Unter der Voraussetzung, daß der gesunde Mensch ca. 7000/mm³ peripheren Blutes aufweist, wovon 30 %, also 2100, Lymphozyten sind, besitzt er demnach pro mm³ peripheren Blutes mindestens 700 T-Lymphozyten.

4.5 Das T-Zell-kompartiment bei chronischer Lymphadenose:

Patient Hu.J. S 28 PHA:

14,46 % Immunoblasten = 14,46 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 6100 Leukozyten/mm³ 48 %, also 2928 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 423 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient Hu.J. S 30 PHA:

17 % Immunoblasten = 17 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 6100 Leukozyten/mm³ 48 %, also 2928 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 498 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient R.A. S 36 PHA:

26,52 % Immunoblasten = 26,52 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 15800 Leukozyten/mm³ 80 %, also 12640 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 3352 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient R.A. S 38 PHA:

24,07 % Immunoblasten = 24,07 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 25600 Leukozyten/mm³ 84 %, also 21504 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 5176 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient Hög.J. S 41 PHA:

4,42 % Immunoblasten = 4,42 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 29900 Leukozyten/mm³ 98 %, also 29302 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 1295 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient Hög.J. S 43 PHA:

8,97 % Immunoblasten = 8,97 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 26500 Leukozyten/mm³ 98 %, also 25970 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 2330 T-Lymphozyten vorhanden.

Patient Hög.J. S 44 PHA:

7,89 % Immunoblasten = 7,89 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 26500 Leukozyten/mm³ 98 %, also 25970 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also wenigstens 2049 T-Zellen vorhanden.

Patient S.W. S 47 PHA:

21 % Immunoblasten = 21 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 42400 Leukozyten/mm³ 93 %, also 39432 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 8281 T-Zellen vorhanden.

Patient S.W. S 48 PHA:

12,32 % Immunoblasten = 12,32 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 5400 Leukozyten/mm³ 91 %, also 4914 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also wenigstens 605 T-Zellen vorhanden.

Patient S.W. S 51 PHA:

37,28 % Immunoblasten = 37,28 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 5000 Leukozyten/mm³ 73 %, also 2190 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also wenigstens 816 T-Zellen vorhanden.

Patientin K.C. S 53 PHA:

2,38 % Immunoblasten = 2,38 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 813000 Leukozyten/mm³ 100 %, also 813000 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 19349 T-Lymphozyten vorhanden.

Bei der CLL ist also unseren Untersuchungen gemäß das T-Zellcompartiment absolut größer als bei Normalpatienten. Dies ist umso deutlicher, je stärker die Malignität des Prozesses ausgeprägt ist. Bei der CLL findet sich also neben der das Neoplasma quantitativ bestimmenden B-Zellproliferation auch eine Zunahme der T-Zellbildung. Relativ jedoch ist der T-Zellanteil vermindert, was wiederum umso deutlicher ist, je stärker die Malignität des Prozesses und damit die B-Zellvermehrung ausgeprägt ist.

4.5.4 Das T-Zellcompartiment bei der Lymphogranulomatose:

Patientin A.R. S 24 PHA:

18,55 % Immunoblasten = 18,55 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 18300 Leukozyten/mm³ 7 %, also 1281 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 238 T-Zellen vorhanden.

Patient Hö.A. Aw PHA:

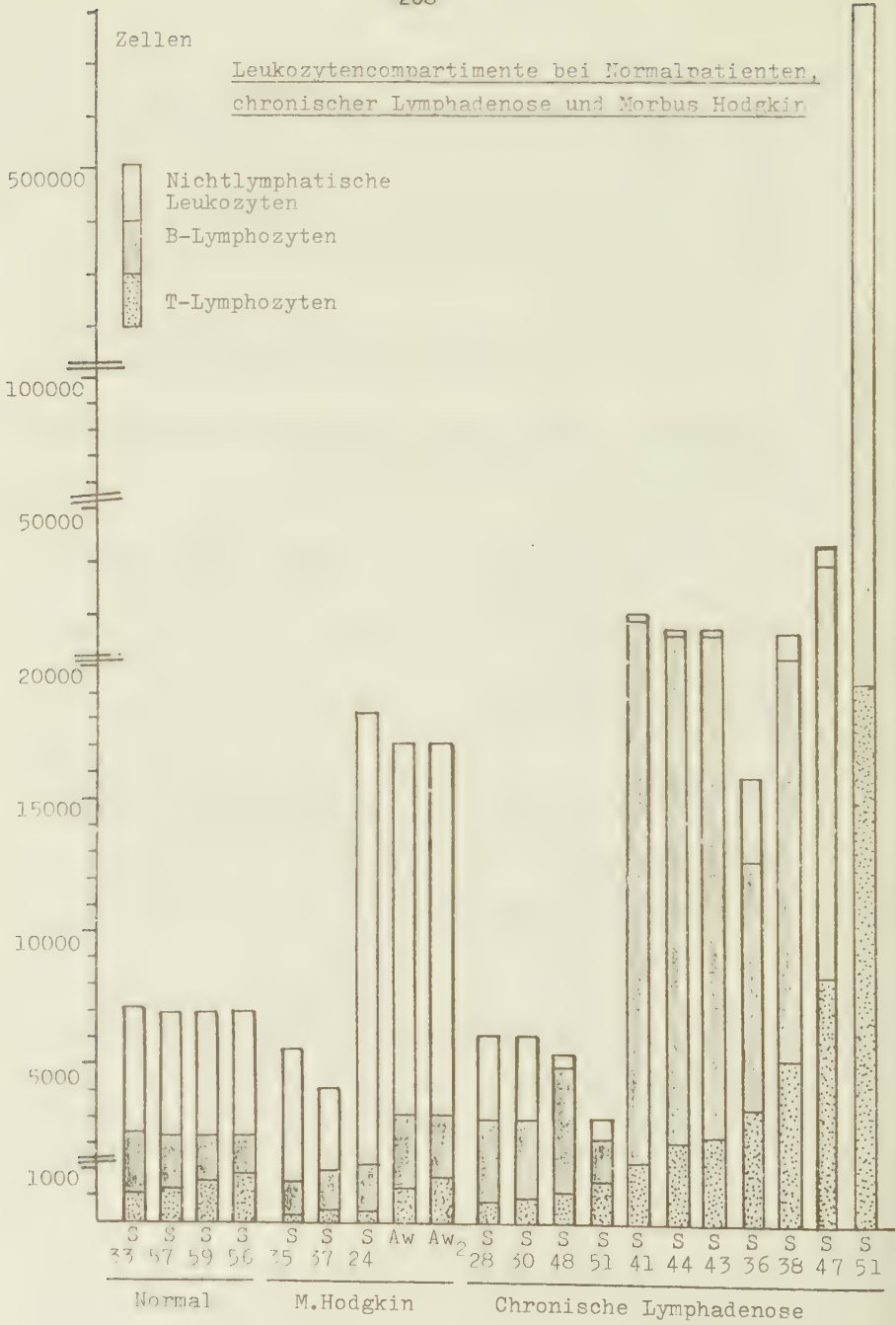
21,90 % Immunoblasten = 21,90 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 17100 Leukozyten/mm³ 18 %, also 3078 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 674 T-Zellen vorhanden.

Patient Hö.A. Aw₂ PHA:

28,13 % Immunoblasten = 28,13 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 17100 Leukozyten/mm³ 18 %, also 3078 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also mindestens 866 T-Zellen vorhanden.



Patient M.F. S 35 PHA:

17 % Immunoblasten = 17 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 5600 Leukozyten/mm³ 14 %, also 784 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also wenigstens 133 T-Zellen vorhanden.

Patient M.F. S 37 PHA:

25,59 % Immunoblasten = 25,59 % T-Zellen

Im peripheren Blut fanden sich bei 4100 Leukozyten/mm³ 24 %, also 984 Lymphozyten. Pro mm³ peripheren Blutes waren also wenigstens 252 T-Lymphozyten vorhanden.

Unseren Untersuchungen gemäß ist also das T-Zellcompartment bei der Lymphogranulomatose prozentual grundsätzlich kleiner als bei Normalpatienten. Absolut dagegen entspricht es bei peripherer Leukozytose und damit nur relativer Lymphopenie in etwa dem Normal-T-Compartment. Bei peripherer Leukopenie und damit absoluter Lymphopenie (Patient M.F.) ist es auch absolut kleiner als bei Normalpatienten.

4.54 Diskussion: Wie in der Einleitung ausgeführt (s.dort), sind die T-Zellen die wesentlichen Träger der cellulären Immunität. Da die celluläre Immunität des Normalpatienten als intakt vorausgesetzt werden kann, soll sie eingangs besprochen werden, um später zum Vergleich zu dienen.

Im peripheren Blut des Normalpatienten finden sich im Mittel pro mm³ 7000 Leukozyten. In der Regel sind 30 % davon, also 2100 Zellen, Lymphozyten. Diese Lymphozytenpopulation zerfällt wie ausgeführt in das T- und das B-Zellcompartment.

In Normalkulturen transformieren unter PHA-Wirkung *in vitro* durchschnittlich 33,12 % (Schwankungsbreite 24,11 - 43,06 % (s. 4.51)) der Lymphozyten zu Immunoblasten und demaskieren sich so als T-Zellen. Dieser Wert markiert aus den besprochenen Gründen eine untere Grenze des T-Zellcompartiments, diese allerdings ziemlich genau.

Auf die Verhältnisse im peripheren Blut übertragen bedeutet dies, daß pro mm^3 33,12 % (Schwankungsbreite 24,11 - 43,06 % (s. 4.51)) der Lymphozyten T-Zellen sind. In absoluten Zahlen ausgedrückt finden sich dann pro mm^3 peripheren Blutes durchschnittlich 749 T-Zellen (Schwankungsbreite 565 - 965 (s. 4.51 und Graphik S 33 - S 59)).

Bei normergischer Reaktionslage der cellulären Immunität finden sich also pro mm^3 peripheren Blutes mindestens 749 T-Zellen, die bei Kontakt mit spezifischen Antigenen nach Rezirkulation ins lymphatische System zu Mutterzellen immunkompetenter kleiner T-Lymphozyten und damit immunkompetenter Zellklons werden können.

Beim CLL-Patienten ist die Leukozytenzahl pro mm^3 peripheren Blutes vom Stadium der Erkrankung abhängig und wird wesentlich durch die Vermehrung des Anteils der Lymphozyten an der Gesamtzahl der weißen Blutzellen bestimmt. Allgemein kann zunächst festgestellt werden, daß der relative Lymphozytenanteil in der Regel höher als 30 % und damit höher als bei Normalpatienten liegt.

Im Mittel transformieren 16,03 % der Kulturlymphozyten unter PHA-Wirkung zu Immunoblasten und demaskieren sich damit als T-Zellen. Der relative T-Zellanteil liegt durchschnittlich also um 50 % niedriger als bei Normal-

patienten. Dabei ist der Transformationserfolg der peripheren Lymphozytose umgekehrt proportional und somit beim Patienten S.W. S 51 PHA bei 2190 Lymphozyten pro mm^3 peripheren Blutes mit 37,28 % Blasten am größten, bei der Patientin K.C. S 53 PHA bei 813000 Lymphozyten pro mm^3 peripheren Blutes mit 2,38 % Blasten am geringsten.

Auf die Verhältnisse im peripheren Blut übertragen bedeutet dies, daß der relative T-Zellanteil umso geringer ist, je stärker ausgeprägt die periphere Lymphozytose, je weiter fortgeschritten also die Erkrankung und damit die B-Zellvermehrung ist. Die absolute Größe des T-Zellcompartiments dagegen nimmt mit der peripheren Lymphozytose beständig zu, wie die Graphik zeigt.

Eine relativ gering fortgeschrittene Form der Erkrankung findet sich beim Patienten Hu.J.. Pro mm^3 peripheren Blutes lassen sich 6100 Leukozyten nachweisen, von denen 48 %, also 2928 Zellen, Lymphozyten sind. Bei einer relativen Größe des T-Zellcompartiments von 14,46 % (S 28) bzw. 17,0 % (S 30) finden sich pro mm^3 peripheren Blutes zwischen 423 und 498 T-Zellen. Berücksichtigt man die geringe Leukopenie, so liegt die absolute Größe des T-Zellcompartiments im unteren Normbereich. (s. 4.52 und Graphik).

Beim Patienten S.W. fanden sich zum Zeitpunkt der Ansätze S 48 und S 51 pro mm^3 peripheren Blutes 5400 bzw. 3000 Leukozyten, von denen 91 %, also 4914, bzw. 73 %, also 2190 Zellen, Lymphozyten waren. Bei einem relativen T-Zellanteil von 12,32 % (S 48) bzw. 37,28 % (S 51) fanden sich pro mm^3 peripheren Blutes 605 bzw. 816 T-Zel-

len, was einer normergischen Reaktionslage der zellulären Immunität entspricht. Beim Patienten S.W. finden sich also bei deutlicher Leukopenie Normalpatienten analoge T-Zellzahlen, was letztlich dadurch zu erklären ist, daß die große Mehrzahl der vorhandenen Leukozyten der Grundkrankheit entsprechend Lymphozyten sind. Dabei sind dann die Lymphozytencompartimente trotz Leukopenie genau so groß bzw. im Fall S 48 sogar doppelt so groß wie bei Normalpatienten (s.Graphik bzw. 4.52).

Beim Patienten Hög.J. haben wir mit 29900 bzw. 26500 Leukozyten pro mm³ peripheren Blutes, von denen 98 %, also 29302 bzw. 25970 Zellen, Lymphozyten sind, eine der CLL entsprechende, massive Leuko- wie Lymphozytose. Die relative Größe des T-Zellcompartiments ist dabei bei Schwankungen zwischen 4,42 % und 8,97 % ziemlich gering. In absoluten Zahlen ausgedrückt finden sich aber pro mm³ peripheren Blutes zwischen 1295 und 2330 T-Zellen. Damit ist das T-Zellcompartiment 2 - 3 mal so groß wie bei Normalpatienten (s.Graphik bzw. 4.52).

Beim Patienten R.A. ist das T-Zellcompartiment mit 3352 Zellen pro mm³ peripheren Blutes 4 bzw. mit 5176 Zellen 7 mal so groß wie bei Normalpatienten. Beim Patienten S.W. (Ansatzzeitpunkt S 47) ist es mit 8281 T-Zellen pro mm³ peripheren Blutes sogar 11 mal so groß wie das Normal-T-Compartiment. Den absolut größten Umfang bei relativ kleinstem Umfang (2,38 %) aber hat das T-Zellcompartiment bei der Patientin K.C., wo sich bei 81'000 Lymphozyten pro mm³ peripheren Blutes 19349 T-Zellen finden. In diesem Finalstadium einer chronischen Lymphadenose ist damit das T-Zellcompartiment 26 mal so groß wie bei Normalpatienten.

Insgesamt läßt sich also feststellen, daß die Größe des CLL-T-Zellcompartiments bei relativ gering fortgeschrittenen Stadien der Krankheit mit fehlender Leukozytose aufgrund der starken Lymphozytose in etwa der des Normal-T-Compartiments entspricht. Im Rahmen der Progredienz der Erkrankung kommt es zu einer Vergrößerung des T-Zellcompartiments in Korrelation mit einer Zunahme der Leuko- wie Lymphozytose. Dabei nimmt die Steilheit des Anstiegs mit der B-Zellvermehrung ab. So finden sich z.B. beim Patienten R.A. bei 12640 Lymphozyten pro mm^3 peripheren Blutes 3352 T-Zellen. Beim Patienten S.W. lassen sich bei mehr als 3 mal so viel, nämlich 39432 Lymphozyten, nur 2,5 mal so viel, nämlich 8281 T-Zellen, nachweisen. Bei der Patientin K.C. haben wir bei 21 mal so viel Lymphozyten wie beim Patienten S.W. (S 47), nämlich 813000, nur 2,3 mal so viel, nämlich 19349 T-Zellen.

Bei der Lymphogranulomatose findet sich im Gegensatz zur CLL eine Lymphopenie. Ist diese Lymphopenie absolut, so ist das T-Zellcompartiment erheblich kleiner als bei Normalpatienten. Als Beispiel sei der Patient M.F. (S 35) mit 5600 Leukozyten pro mm^3 peripheren Blutes angeführt, von denen 14 %, also 784 Zellen, Lymphozyten sind. Beim gleichen Patienten finden sich im Ansatz S 37 4100 Leukozyten pro mm^3 peripheren Blutes, von denen 24 %, also 984 Zellen, Lymphozyten sind. Bei diesem Patienten beträgt

die Größe des T-Zellcompartiments pro mm^3 peripheren Blutes also 17 % T-Zellen (S 35) 133 Lymphozyten sowie bei 25,59 % T-Zellen (S 37) 252 Lymphozyten. Ähnliche Verhältnisse finden sich auch im peripheren Blut der Patientin A.R.. Bei 18300 Leukozyten pro mm^3 peripheren Blutes, von denen 7 %, also 1281 Zellen, Lymphozyten sind, beträgt die Größe des T-Zellcompartiments bei einem relativen T-Zellanteil von 18,55 % 238 Lymphozyten.

Im Gegensatz dazu finden wir beim Lymphogranulomatosepatienten HÖ.A. nur eine relative Lymphopenie. Bei 17100 Leukozyten pro mm^3 peripheren Blutes finden sich 18 %, also 3078 Lymphozyten, von denen 21,90 %, also 674 Zellen (A_w), bzw. 28,13 %, also 866 Zellen (A_{w2}), T-Lymphozyten sind. Hier ist also das T-Zellcompartiment bei nur relativer Lymphopenie ebenso groß wie bei Normalpatienten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß bei der CLL mit der Zunahme der Malignität des neoplastischen Prozesses und damit der Zunahme der Lymphozytose die Größe des T-Zellcompartiments absolut zunimmt, während es sich relativ mehr und mehr verkleinert.

Bei der Lymphogranulomatose dagegen vermindert sich der absolute Umfang des T-Zellcompartiments mit der Lymphopenie. Normale T-Zellzahlen finden sich nur bei relativer Lymphopenie mit an sich normalen Lymphozytenzahlen in Korrelation zu ausgeprägter Leukozytose. Bei absoluter

Lymphopenie dagegen ist das T-Zellcompartment erheblich kleiner als bei Normalpatienten.

4.6 Immunkinetik:

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, daß in vitro unter PHA-Wirkung nahezu ausschließlich kleine T-Zellen zu Immunblasten transformieren. Mittlere und große Lymphozyten nehmen an der Blastenbildung nicht teil und sind somit als B-Zellen zu werten.

Nun soll noch die Zusammensetzung des transformierenden kleinen T-Zellcompartiments untersucht werden, d.h. es soll gezeigt werden, in welchem Verhältnis markierte und nicht markierte kleine T-Lymphozyten bei den einzelnen Patientengruppen am Umsatz teilnehmen.

Radioaktives Nukleosid wird nur von im Zeitraum der Vivomarkierung neu gebildeten Zellen eingelagert. Neu gebildete Lymphozyten sind aber, wie in der Einleitung unter 1.4 ausgeführt, sowohl bei Normalpatienten als auch bei der chronischen Lymphadenose und der Lymphogranulomatose zu 90 % kurzlebige Zellen.

Da einerseits davon ausgegangen werden kann, daß im Zeitraum der Vivomarkierung keine Zellen entstanden sind, die nicht markiert sind, andererseits die Lebensspanne kurzlebiger Lymphozyten und damit auch kurzlebiger T-Zellen einen Zeitraum von 10 - 20 Tagen nicht übersteigt, sind somit die meisten nicht markierten Lymphozyten in der Kultur langlebige Zellen.

Die markierten T-Zellen sind also mehrheitlich kurzlebig, die nicht markierten langlebig. Somit kann anhand der Aufschlüsselung des transformierenden T-Zellcompartiments nach der Markierung gezeigt werden, in welchem Ausmaß langlebige bzw. kurzlebige T-Zellen bei den einzelnen Patientengruppen die Blastenbildung bestimmen.

Diese Aufschlüsselung gelingt am besten, wenn man den Markierungsindex der kleinen Lymphozyten in vivo am Ansatztag mit dem Markierungsindex der Immunblasten in vitro am Haupttransformationstermin in Korrelation zum Erwartungsmarkierungsindex der Immunblasten bei unselektionierter Transformation vergleicht.

Dies soll an einem Beispiel (Patientin B.R. S 56, s. Tabelle I) verdeutlicht werden. In diesem Fall betrug der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten in vivo am Ansatztag 2,36 %. Zum Zeitpunkt der Haupttransformation fanden sich 43,06 % Immunblasten, d.h. 43,06 von 100 Kulturzellen (= $43,06/100$) waren Blasten. Bei unselektionierter Transformation markierter wie nicht markierter kleiner T-Zellen hätte sich nach $2,36 \times 43,06/100$ ein Erwartungsmarkierungsindex der Blastenfraktion von 1,02 % ergeben müssen. Tatsächlich lag der Blastenmarkierungsindex mit 2,41 % etwa doppelt so hoch wie der Erwartungsmarkierungsindex und sogar etwas höher als der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten in vivo am Ansatztag ($2,41\% / 2,36\%$). Somit war das T-Zellcompartiment, das zu Blasten transformierte, mit 2,41 % signifikant stärker markiert als der Durchschnitt der kleinen Lymphozyten mit 2,36 %. Da der Markierungsindex der kleinen Fraktion am Ansatztag in vivo und der der Blastenfraktion am Haupttransformationstermin in vitro nahezu

zusammenfielen, transformierten markierte wie nicht markierte kleine T-Zellen relativ unselektioniert zu Immunoblasten.

Analoge Berechnungen wurden bei allen anderen Patienten durchgeführt. Die Ergebnisse sind für die einzelnen Patientengruppen in den Tabellen I - III angeführt. Die beiden wichtigsten Parameter - Markierungsindex der kleinen Lymphozyten am Ansatztag *in vivo* und der Immunoblasten am Haupttransformationstermin *in vitro* - wurden des weiteren zeichnerisch in Korrelation gesetzt (s. zugehörige Graphik).

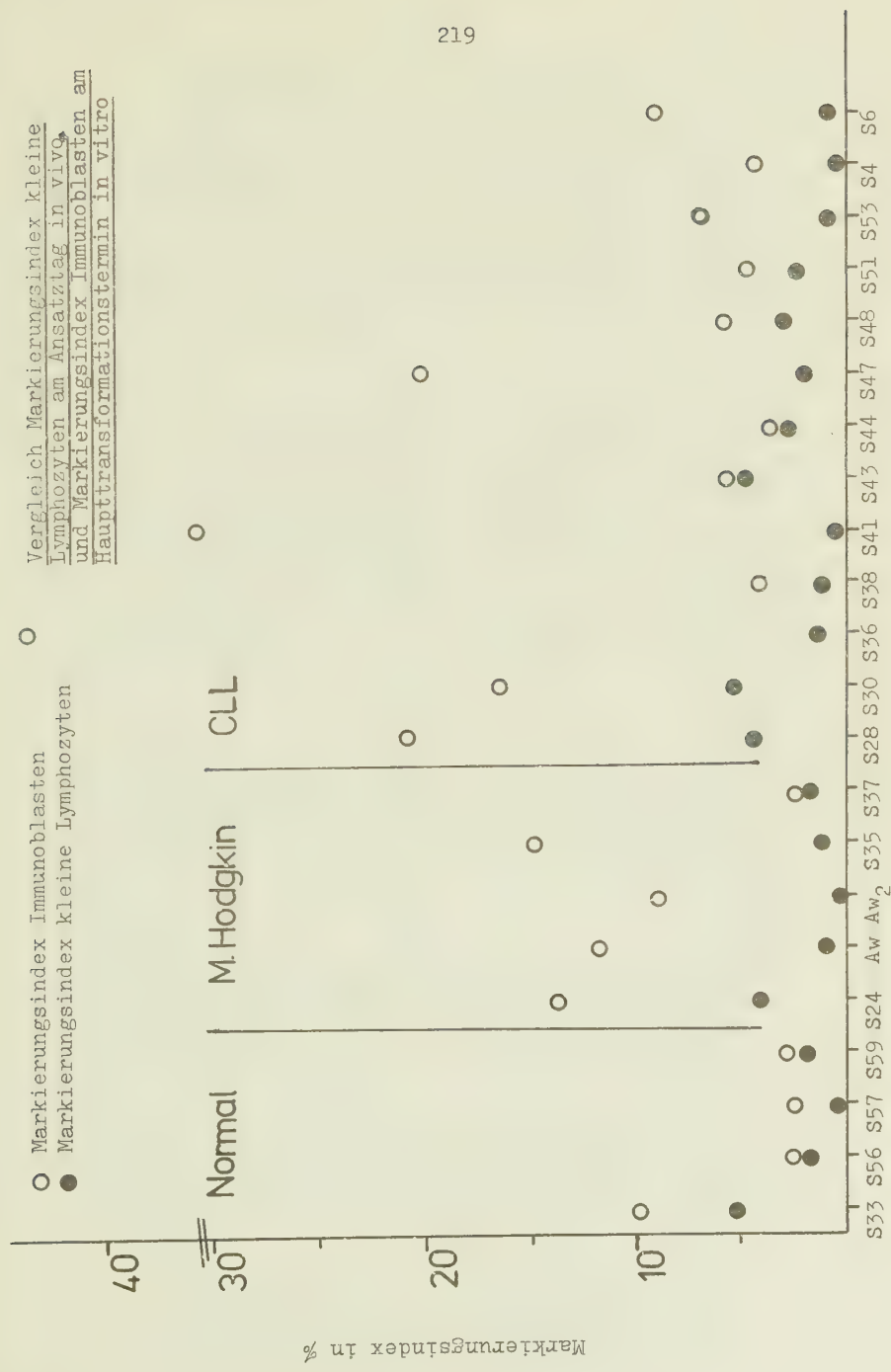
Bei den Normalpatienten (s. Tabelle I und Graphik) liegt der Markierungsindex der Immunoblasten am Haupttransformationstermin nur knapp über dem Markierungsindex der kleinen Lymphozyten *in vivo* am Ansatztag (S 56, S 59) und ist maximal 4 mal so groß wie dieser (S 57). Im Mittel liegt der Blastenmarkierungsindex am Haupttransformationstermin etwa doppelt so hoch wie der der kleinen Lymphozyten am Ansatztag *in vivo*. Daraus folgt, daß markierte wie nicht markierte kleine T-Zellen bei einer geringgradig stärkeren Beteiligung der markierten Zellen relativ unselektioniert Immunoblasten bilden. Im Normalfall nehmen also langlebige wie kurzlebige T-Zellen bei einem relativ geringen Überhang zur Seite der kurzlebigen verhältnismäßig gleichmäßig an der Blastopoese teil.

Bei der Lymphogranulomatose dagegen liegt der Blastenmarkierungsindex im Mittel 15 mal so hoch wie der der kleinen Lymphozyten am Ansatztag *in vivo*. Kurzlebige markierte T-Zellen sind also in viel stärkerem Ausmaß an der

Blastopoese beteiligt als nicht markierte langlebige, was gut mit den Befunden von Schick (177) korreliert, wonach bei der Lymphogranulomatose der Zustrom langlebiger Lymphozyten drastisch vermindert ist, während vermehrt kurzlebige Zellen produziert werden.

Bei der chronischen Lymphadenose liegt der Blastenmarkierungsindex im Mittel - bei breiter Streuung - 10 mal so hoch wie der der kleinen Lymphozyten am Ansatztag in vivo. Im Extremfall fallen beide Indices nahezu zusammen (S 43 und S 44) bzw. liegt der Blastenmarkierungsindex 50 mal so hoch wie der der kleinen (S 36). Auch bei der Lymphadenose transformieren also markierte kurzlebige T-Lymphozyten in viel stärkerem Ausmaß zu Immunblasten als nicht markierte langlebige. Daß der Anteil kurzlebiger T-Lymphozyten an der Transformation im Mittel nicht ganz so hoch ist wie beim Morbus Hodgkin, liegt wohl daran, daß bei der CLL nach den Befunden von Schick (177) sowohl die Produktion kurzlebiger als auch die langlebiger Lymphozyten erheblich gesteigert ist (s.auch Einleitung 1.4).

Im Rahmen der verzögerten Transformation der CLL-T-Zellen nimmt, wie beschrieben, der Blastenmarkierungsindex weiter zu und liegt im Mittel 18 mal höher als der Markierungsindex der kleinen Lymphozyten am Ansatztag in vivo. Zu späten Terminen bestimmen also markierte kurzlebige T-Zellen in noch stärkerem Maß als im Rahmen der Haupttransformation die Blastopoese.



Vergleich Markierungsindex kleine Lymphozyten am Ansatztag in vivo und Markierungsindex Immunoblasten am Haupttransformationstermin in vitro

Tabelle I Immunkinetik: Normalpatienten

Patient	MI KL vivo Ansatztag	MI KL vitro Hafttag- formation	LB in % vitro Hafttag- formation	LB-Erwartungs-Mi vitro Hafttag-formation	LB MI vitro Haupt- transformation
He.A.S55	5,63 %	3,14 %	2,11 %	1,56%=13,6‰=14/1000	10,00%=100‰=100/1000
B.R.S56	2,36 %	1,33 %	43,06 %	1,02%=10,2‰=10/1000	3,41%=34,1‰=34/1000
B.R.S57	0,62 %	0,51 %	29,09 %	0,18%=1,8‰=2/1000	40,83%=408,3‰=408/1000
B.R.S59	1,93 %	1,44 %	36,23 %	0,76%=7,6‰=7/1000	3,00%=30,0‰=30/1000

Tabelle II Immunkinetik: Lymphogranulomatose

Patient	MI KL vivo Ansatztag	MI KL vitro Hafttag- formation	LB in % vitro Hafttag- formation	LB-Erwartungs-Mi vitro Hafttag-formation	LB MI vitro Haupt- transformation
A.R.S24	4,27 %	3,12 %	18,55 %	0,76%=7,6‰=7/1000	3,41%=34,1‰=34/1000
Hö.A.Aw	1,05 %	7,47 %	21,90 %	0,22%=2,2‰=2/1000	11,87%=119‰=119/1000
Hö.A.Aw ₂	0,20 %	1,67 %	28,13 %	0,03%=0,3‰=1/1000	0,11%=1,1‰=1/1000
M.F.S55	1,25 %	2,23 %	17,00 %	0,21%=2,1‰=2/1000	15,03%=150,3‰=150/1000
M.F.S57	2,42 %	1,22 %	25,59 %	0,62%=6,2‰=6/1000	3,00%=30,0‰=30/1000

Tabelle III Immunkinetik: CLL

Patient	MI KL vivo Ansatztag	MI KL vitro Haupttrans- formation	LB in % vitro Haupttrans- formation	LB-Erwartungs-MI vitro Haupttransformation	LB MI vitro Haupt- transformation
Hu.J.S28	4,69 %	9,28 %	14,46 %	0,68% $\pm$ 6,8% $\pm$ 7/1000	21,00% $\pm$ 21,0% $\pm$ 210/1000
Hu.J.S30	5,64 %	5,09 %	17,00 %	0,95% $\pm$ 9,5% $\pm$ 10/1000	16,65% $\pm$ 16,6% $\pm$ 166/1000
R.A.S36	1,61 %	2,40 %	26,52 %	0,4 % $\pm$ 4, % $\pm$ 4/1000	44,00% $\pm$ 440% $\pm$ 496/1000
R.A.S38	1,35 %	4,05 %	24,07 %	0,32% $\pm$ 3,2% $\pm$ 3/1000	4,66, % $\pm$ 4,6% $\pm$ 44/1000
Hög.J.S41	0,64 %	6,61 %	4,42 %	0,0 % $\pm$ 0, % $\pm$ 0/1000	32,00% $\pm$ 320% $\pm$ 32/1000
Hög.J.S43	5,07 %	0,98 %	8,97 %	0,45% $\pm$ 4,5% $\pm$ 5/1000	5,88% $\pm$ 59% $\pm$ 59/1000
Hög.J.S44	3,62 %	1,12 %	7,89 %	0,29% $\pm$ 2,9% $\pm$ 3/1000	3,71% $\pm$ 37% $\pm$ 38/1000
S.W.S47	2,14 %	4,17 %	9,65 %	0,21% $\pm$ 2,1% $\pm$ 2/1000	20,46% $\pm$ 205% $\pm$ 205/1000
S.W.S48	3,23 %	2,20 %	12,63 %	0,41% $\pm$ 4,1% $\pm$ 4/1000	6,00% $\pm$ 60% $\pm$ 60/1000
S.W.S51	2,48 %	2,13 %	37,28 %	0,92% $\pm$ 9,2% $\pm$ 9/1000	4,86% $\pm$ 49% $\pm$ 49/1000
K.C.S53	1,03 %	1,30 %	2,38 %	0,02% $\pm$ 0,2% $\pm$ 0/1000	7,00% $\pm$ 70% $\pm$ 70/1000
R.A.S4	0,63 %	1,08 %	23,07 %	0,15% $\pm$ 1,5% $\pm$ 2/1000	4,56% $\pm$ 46% $\pm$ 46/1000
R.A.S6	1,18 %	1,38 %	11,90 %	0,14% $\pm$ 1,4% $\pm$ 1/1000	9,2 % $\pm$ 92% $\pm$ 92/1000

5. Die humoralen, zellvermittelten und zellvermittelten Chronischen, lymphatischen Leukämie und der Lymphomato- matose

5.1 Die normale Physiologie der lymphatischen Zellen

Die undeterminierten Stammzellen der Lymphozytopoese sind mit den pluripotenten Stammzellen der Hämatopoese identisch (146, 228). Beim Menschen stammen sie aus dem Knochenmark (66) und können dort als lymphoide Zellen nachgewiesen werden (56, 170, 219, 230). Aus ihnen entsteht möglicherweise eine bisher allerdings nicht sicher nachgewiesene lymphatisch determinierte Stammzelle (217).

Unter humoralen (51, 60, 202) und ökologischen Einflüssen des Thymus (231) entwickeln sich die Stammzellen der T-Zellreihe. Ein langlebiger aroliferativer und rezirkulierender Anteil dieser T-Zellen besiedelt die thymusabhängigen Areale der sekundären lymphatischen Gewebe (weiße Milzpulpa, paracortikale Lymphknotenregionen). Es sind dies die sogenannten T_1 -Lymphozyten. Sie sind die primär immunkompetenten Lymphozyten (215).

Nach Reaktion mit einem spezifischen Antigen werden diese Zellen aktiviert und transformieren zu Immunoblasten vom Typ der PHA-Blasten. Diese bilden als Mutterzellen spezifischer Immunzellklone Lymphozyten mit verschiedenen Funktionen, die sogenannten T_2 -Lymphozyten. So stellen sie die kurzlebige Fraktion der Suppressor-T-Zellen (105, 155), die kurzlebigen Helfer-T-Zellen (73) und die zytotoxischen Killer-T-Zellen (142).

Daneben entwickelt sich neben der Effektor-T-Zelle mit einer der obigen Funktionen eine spezifische "memory"-Zelle, die langlebig ist und rezirkuliert (44, 71). Diese Gedächtniszellen werden bei erneutem spezifischem Antigenkontakt wieder zu Immunoblasten und lösen so eine sekundäre Reaktion aus. Das Maximum der T-Zellen entfällt, da sie außerhalb des Thymus überwiegend langsam umgesetzt werden, auf diese memory-population (189, 196).

In den bursaäquivalenten Organen (Knochenmark, lymphatisches Darmorgan, Milz, Leber) entstehen die B-determinierten Stammzellen. Aus ihnen entwickeln sich die B_1 -Lymphozyten, die sich in den B-Regionen von Milz und Lymphknoten ansiedeln (152).

Auf Antigenreiz treten zwei verschiedene Reaktionsformen auf (7): die Plasmazellreaktion führt zur Ausbildung von Plasmazellen, die primär fast ausschließlich IgM-Antikörper produzieren (223). Diese Reaktion ist T-Zell-unabhängig (198). Die Keimzellreaktion (63) dagegen, in deren Verlauf es zur Entwicklung von Keimzentren morphologisch abgrenzbarer Zentrozyten und langlebiger B-memory-Zellen kommt (125), ist T-Zell-abhängig. Die B-Gedächtniszellen reifen bei erneutem Antigenkontakt wahrscheinlich zu Immunoblasten und Zentroblasten (162). Diese sind für eine Sekundärreaktion verantwortlich, bei der vor allem IgG synthetisiert wird.

5.2 Pathophysiologische Mechanismen bei der chronischen lymphatischen Leukämie

Die chronische Lymphadenose ist eine B-Zell-Leukämie. Wir konnten im Rahmen unserer Untersuchungen durch Anwendung des vorwiegend T-stimulatorischen PHA bis zu 90 % der gefundenen Lymphozyten der B-Zellreihe zuordnen. Dabei waren relative und absolute B-Zellvermehrung der Malignität des Prozesses direkt proportional.

Diese B-Zellen weisen gegenüber normalen B-Lymphozyten einige Besonderheiten auf. So spricht ein monotoner Ig-Besatz (meist IgM, häufig auch IgD) für Monoklonalität (80, 100, 159, 166, 183). Die Dichte des Ig-Besatzes an der Zelloberfläche ist deutlich niedriger als bei normalen B-Lymphozyten (98, 137, 205, 226). Auch die Dichte des Fc-Rezeptors für aggregiertes IgG (157) und die IgG-Dichte sind vermindert (208). Des weiteren besteht ein Verlust der Konfluenz von Oberflächenimmunglobulinen ("cap-formation") bei CLL-Lymphozyten (98, 137). Nach Beobachtungen von Davis (52) und Rudders (172) kann im Krankheitsverlauf ein Wechsel der Oberflächenmarkierung auftreten.

An intrazellulären strukturellen Besonderheiten finden sich nur kurze Stränge von granuliertem endoplasmatischem Retikulum (23) und kristalloide Einschlüsse als Hinweis auf eine gestörte Ig-Synthese (37). Huhn und andere (101) konnten die Monoklonalität dieser Einschlussglobuline belegen. Elektronenmikroskopische Analysen bei Cohnen (38) belegten schließlich das Ausbleiben einer Differenzierungsmöglichkeit zu Plasmazellen mit den Strukturen der Immunglobulinsekretion, wie sie normale B-Zellen leisten.

Es findet sich also bei der chronischen Lymphadenose eine pathognomonische B-artige Lymphozytenpopulation, die eine Reihe struktureller und biochemischer Atypien aufweist. Die Zellen unterscheiden sich von normal ausgereiften B-Zellen durch gestörte Oberflächeneigenschaften, monoklonale Prägung und fehlende Differenzierungsmöglichkeit zu Plasmazellen bei ausbleibender Ig-Sekretionsleistung. Sie sind wahrscheinlich den B₁-Zellen verwandt und machen bis zu 90 % der Lymphozytenpopulation bei der chronischen Lymphadenose aus.

Wie Catovsky und andere (31) sowie Mellstedt und andere (138) konnten auch wir in unseren Untersuchungen (s.4.5) in absoluten Werten eine normale, in den meisten Fällen sogar erhöhte T-Zellzahl bei der CLL nachweisen. Selbst in fortgeschrittenen Stadien mit massiver Lymphozytose bleibt bei abnehmendem relativem Anteil die absolute Größe des T-Zellcompartiments - zum Teil erheblich (s.4.5 Patientin K.C. S 53) - über der Normgrenze.

Diese CLL-T-Zellfraktion weist deutliche Zeichen von Kurzlebigkeit und raschem Umsatz auf (s.4.6). Normale T-Zellen sind in ihrer großen Mehrzahl langlebig und langsam umsetzend (105, 155). Nur die relativ kleine, beim Menschen allerdings nicht genau quantifizierte, Population der Suppressor- und Helfer-T-Zellen ist kurzlebig (73, 105, 155).

Im übrigen erfolgt bei der CLL eine qualitativ normale Reifung nichtlymphatischer Leukozyten, so daß die im Krankheitsprozeß zunehmende Granulozytopenie keine

qualitative Störung der Myelopoese sondern eine quantitative Reduktion der Zellzahlen für die Strombahn repräsentiert.

Die krankheitsspezifische Zellreifungsstörung bei der CLL dürfte eine Ausdifferenzierungsstörung der determinierten Stammzelle (B_0) sein, die eben noch rudimentäre Charakteristika von B_1 annehmen kann. Dafür spricht das völlige Fehlen von Zentroblasten und Zentrozyten im CLL-Lymphknotengewebe sowie das weitgehende Fehlen normaler Blasten und Plasmazellen (126). Die wenigen noch entstehenden Plasmazellen und die noch sezernierten Immunglobuline entstammen wahrscheinlich dem Rest einer nicht alterierten B_1 -Zellreihe. Da ein langsam erschöpfbares Stammzellreservoir sich nur auf der Ebene der determinierten Stammzellen findet (215, 216), müßten sich diese normalen B_1 -Reihen von einem Restbestand unalterierter B_0 -Zellen ableiten, die der spezifischen Noxe entgingen. Die zunehmende Erschöpfung dieser Zellreihe spricht dafür, daß die krankheitsspezifische Alteration alle neu nach B_0 einfließenden Zellen erfaßt, bis ihr ungeschädigter Rest (nach durchschnittlich 5 Jahren) erschöpft ist.

Gegen eine Störung auf der früheren Ebene der lymphatisch determinierten Stammzelle vor einer T-B-Determinierung spricht insbesondere die Tatsache normaler bzw. sogar erhöhter T-Zellzahlen im Lauf der Erkrankung (s.4.5). Nun ist allerdings der T-Zellumsatz sehr langsam (189, 196), so daß bei einem Stop des Einstroms lymphatischer Stammzellen in die T-Reihe, der Vorrat vorhandener determinierter T-Stammzellen ausreichen würde, um normale T-Zellspiegel über Jahrzehnte zu ge-

währleisten, wie Befunde bei jugendlichen Thymektomierten und bei der Altersinvolution des Thymus belegen (55, 194, 196). Die Tatsache normaler T-Zellzahlen allein spricht also eigentlich noch nicht gegen eine Störung auf dieser Ebene, die Tatsache gesteigerter T-Zellzahlen - zumal in fortgeschrittenen Stadien (s.4.5 Patientin K.C. S 53) - dagegen macht sie sehr unwahrscheinlich.

Eine Störung auf der noch früheren Ebene der pluripotenten undeterminierten Stammzelle müßte, da alle hämatopoetischen Fraktionen betroffen wären, innerhalb 20 Tagen zu einer Agranulozytose und einem Monozytenschwund führen (66, 214), und ist somit bei einer normalen Ausreifung nicht lymphatischer Leukozyten völlig unwahrscheinlich.

Während nun normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellabbau existiert, ist diese Homöostase bei der CLL gestört. Bei diesen undifferenzierten B-Zellen ist die Weiterentwicklung zu Plasmazellen unterbrochen und es ist kein Antigen bekannt, auf dessen Zufuhr hin ihre Elimination als Effektorzellen erfolgen könnte. Sie sind im Sinne der Definition von Dameshek (47) "immunologisch inkompetente Lymphozyten". Die normalen Regulationsmechanismen sind aber an das funktionelle Aufgehen der Zellen in der Antigenbewältigung und damit an Antigen-erkennende Oberflächenstrukturen geknüpft (142). Somit bedingt die sich in gestörten Oberflächenstrukturen ausdrückende und durch sie bedingte Afunktionalität der CLL-B-Zellen ihre Eliminationsstörung. Dies führt zu einer Akkumulation undifferenzierter B-Zellen.

Als zweiter pathomechanischer Faktor der Lymphozytenakkumulation bei der CLL muß die Steigerung der Produktion langlebiger Lymphozyten auf das Zehnfache des Normalen angesehen werden. Gemäß Trepel und Schick (217) und Schiffer (180) kommt es im Krankheitsverlauf zu einer exponentiellen Zellverdoppelung. Dieser Akkumulationsmodus setzt voraus, daß aus den Teilungen der Vorläuferzellen nicht nur langlebige afunktionelle Folgezellen resultieren, sondern daß gleichzeitig über einen Teil der Folgeprodukte der Produktionsspeicher sich zunehmend ausdehnt. Entsprechend dieser Annahme gehen die Blastenteilungsprodukte nicht, wie normal zu erwarten wäre (215), völlig durch Reifungsteilungen in Folgezellen (große und kleine Lymphozyten) auf, sondern unterhalten im Gegenteil ihr eigenes Compartment. Diese Funktion macht sie gleichsam zu "self-feeder"-Zellen (113).

Zum dritten ist auch die Produktion kurzlebiger Lymphozyten gegenüber Normalbefunden auf das Zehnfache gesteigert. Dabei können die großen Lymphozyten insgesamt als kurzlebige Fraktion angesehen werden. Daneben finden sich aber auch kurzlebige Lymphozyten in der kleinen Fraktion. Dabei zeigen unsere Untersuchungen (s.4.6 Immunkinetik), daß bei der CLL die PHA-reaktiven und somit als T-Zellen zu definierenden Lymphozyten zum großen Teil einer überdurchschnittlich rasch umsetzenden Fraktion kleiner Lymphozyten entstammen. Demnach gehört etwa die Hälfte der bei der CLL vermehrt auftretenden T-Zellen einer sich rasch umsetzenden Fraktion an (s.4.6 Immunkinetik), wie es für Suppressor- und Helfer-T-Lymphozyten beschrieben ist (67, 105, 155).

Somit ergibt sich aus den vorgelegten Daten als Erklärungsmöglichkeit für die Produktionsverhältnisse kleiner kurzlebiger Lymphozyten, daß sie zum größten Teil auf einer gesteigerten Produktion kurzlebiger T-Zellen beruhen.

Nun ist eine maligne transformierte Zelle - somit auch die bei der CLL auftretende maligne transformierte B₁-Zelle - immunologisch ein Allotransplantat (83). Nach der Immunüberwachungstheorie von Burnet (27, 28) können "fremde" Neoplasiezellen durch ihre Oberflächenalteration von den Abwehrzellen erkannt und eliminiert werden. Die hieraus sich ergebende Bedeutung speziell der T-Lymphozyten für die immunologische Tumoralabwehr ist in einer Reihe von experimentellen Ansätzen belegt (117, 143, 203). Allerdings ließen sich auch Hinweise auf eine Suppressorfunktion der B-Zellreihe erbringen (128). Diese Beobachtungen aus der Tumorummunologie wurden dahingehend erweitert, daß Suppressorzellen jede zelluläre und humorale Immunreaktion regulieren (46, 184).

Damit die Suppression ihrerseits nicht überschießt, greifen regulatorische Antisuppressoren in Form einer Rückkoppelung ein (58, 74, 85).

Der häufigste Zustand von Immundefizienz im Erwachsenenalter ist die biologische Abnahme von T-Lymphozyten im Verlaufe des Alterungsprozesses (3, 4, 55). Ihr korreliert die Häufung von Autoimmunerkrankungen mit zunehmendem Alter auf der einen Seite (224) wie von Lymphomen auf der anderen Seite (24, 138). Obwohl die Suppressor-T-Zellen in diesen Untersuchungen nicht

speziell isolierbar sind, ist eine dem allgemeinen Absinken der T-Zellen parallele Abnahme dieser Fraktion als Ursache dieser gehäuften Tumorzinzidenz zu diskutieren.

Zusammenfassend stellt sich die chronische Lymphadenose als Ausdruck einer Entwicklung einer alterierten lymphatischen Zellpopulation zum Zeitpunkt altersbedingt nachlassender Immunüberwachung dar. Die entstehende Zellreihe ist monoklonal und trägt Charakteristika einer B_1 -Zelle mit gestörten Oberflächeneigenschaften und enzymatischen Störungen. Sie ist funktionell und damit immunologisch inert. Das Proliferationsverhalten wird durch primäre Generalisation und exponentiellen Anstieg der Zellreihe gekennzeichnet. Für diesen Expansionsmechanismus ist ziemlich sicher eine Selbstreduplikation verantwortlich analog dem Verhalten von Gedächtniszellen. Anstelle der Effektorzellen entsteht jedoch zum Teil durch Retransformation eine proliferative Blastzelle, was zur Ausdehnung des Vorläufercompartiments und schließlich zur gesteigerten Produktion von Lymphozyten führt.

Diese so das Krankheitsbild mit 95 % beherrschenden kleinen B_1 -artigen Lymphozyten sind durch ihre völlige immunologische Afunktionalität normaler Elimination entzogen. Ihre durchschnittliche Lebenszeit ist auf das Fünffache normaler langlebiger Lymphozyten verlängert (207). Die Produktionssteigerung und Eliminationsstörung dieser Zellpopulation zusammen führen dann zur Lymphozytenakkumulation.

Neben dieser beherrschenden B₁-Fraktion zirkuliert eine funktionell wohl weitgehend normale T-Zellpopulation, die entsprechend unseren Untersuchungen in der Regel erheblich größer war als im Normalfall. Die kinetisch belegte Steigerung der Zahl kurzlebiger kleiner Lymphozyten von normaler Lebensdauer (s.4.6) fand in dieser Population ihr Korrelat.

Diese kinetischen Eigenschaften konnten als Hinweis auf Suppressor- oder Helfer-Zellcharakter dieser T-Lymphozyten gewertet werden.

Die physiologische Vernetzung der besprochenen Zellsysteme und die zitierten Vorstellungen zur immunologischen Abwehr von Alterierungen legen es nahe, kausale Verknüpfungen der Störungen in den einzelnen Zellreihen untereinander zu suchen.

Demnach läßt sich in einer gesteigerten Proliferation kurzlebiger T-Zellen eine Reaktion auf die Entwicklung der in ihren Antigeneigenschaften veränderten pathologischen B-Zellen im Sinne eines Suppressormechanismus sehen.

Da wir zunächst ein altersbedingtes Absinken der T-Zellaktivität als einen Faktor der Genese der pathologischen Zellentwicklung sahen, zeigt sich in den Hinweisen auf eine mögliche Vermehrung von Suppressor-T-Zellen eine zweite, reaktive Phase in der Krankheitsentwicklung.

Nun geht die offenbare Ineffizienz der T-Suppressorreaktion gegenüber der pathologischen Zelllinie einer zunehmenden Verdünnung ihrer Konzentration (= relative

Anzahl in %) parallel. Die Befunde von Thong und anderen (210) sowie Bash und anderen (8) weisen auf die Bedeutung der Zellkonzentration hin: sensibilisierte und dadurch kurzlebige T-Zellen in normaler Konzentration stimulieren über Lymphokine die T-Zellreaktion. Bei erniedrigter Konzentration jedoch kommt es zur Suppression der Reaktion. Im Falle der anzunehmenden Suppressorreaktion käme es so zur Antisuppressorwirkung mit der Folge unbehinderter Entfaltung der Zielzelle, hier der pathologischen CLL-B-Population. Bei den von uns untersuchten Patienten fanden sich im stabilen Stadium der Erkrankung bei mäßiger relativer Erniedrigung absolut erhöhte T-Zellzahlen. Im Verlauf der Erkrankung nahm die absolute T-Zellzahl zwar weiter zu, gleichzeitig verminderte sich allerdings der relative T-Zellanteil an der Gesamtlymphozytenpopulation exzessiv (s.4.5). Dies ist im Sinne zunächst relativ effektiver, schließlich aber erliegender Immunüberwachung zu deuten.

Ob die Steigerung kurzlebiger T-Zellen der Suppressor- oder Antisuppressorreihe zuzuordnen ist, muß offen bleiben. Perera und Pegrum (153) nehmen ebenfalls in Anbetracht der weitgehend normalen T-Zelleistung eine gestörte Suppressorreaktion an. Sie berichten über einen Serumfaktor, der die pathologischen CLL-B-Zellen vor der zytotoxischen Aktivität der T-Zellen schützt. In diesem Faktor wäre unter Umständen das Substrat der Dilutionsreaktion nach Bash (8) zu sehen.

Weiterhin ist die Helferfunktion der T-Zellen durch die gestörte Übermittlung der Lymphokine (142) eingeschränkt. Da zur Entwicklung spezifischer Immunglobuline und speziell zum Umschalten der IgM- auf IgG-Sekretion

aber Interaktionen der B-Zellen mit Helfer-T-Zellen nötig sind (19, 142), ließe sich durch ihre Verdünnung ein Absinken der Ig-Sekretionsleistung in den Krankheitsverläufen erklären, auch wenn man das Vorliegen einer normalen Anzahl primär ungestörter B-Zellen annimmt. Der protrahierte Gammaglobulinabfall im Laufe der Erkrankung entspräche hiernach einem zunehmenden Erliegen der Helfer-T-Zellfunktion auf dem Boden einer Verdünnung durch die überwiegende inerte B-Population. Dieses Konzept sei der klassischen Hypothese der Verdrängung (47) der normalen durch die pathologischen B-Zellen gegenübergestellt, da es für ein in absoluten Werten gesichertes Erliegen der normalen B-Zellreihe keine Verifizierung außer dem erwähnten Immunglobulinabfall gibt.

Abschließend ist noch anzumerken, daß die Befunde über eine Häufung von autoimmunologisch bedingten "idiopathischen" Thrombozytopenien und Erythroblastophthisen (199, 204) die Vermutung nahelegen, daß die gezeigte T-Suppressoraktivität sich auch gegen die myelopoetisch determinierten Stammzellen richten könnte. Dies müßte mit einer Antigenverwandschaft dieser Zellen mit der gering differenzierten CLL-B-Zelle erklärt werden. Die klinisch im Verlauf zunehmend auch ohne Nachweis autoimmunologischer Faktoren im Vordergrund stehende Panzytopenieneigung fände ihre Erklärung in einer derartigen Störung der Myelopoese. Hierzu ist allerdings zu bemerken, daß die Mechanismen der quantitativen "Verdrängung" qualitativ normal ausreifender hämopoetischer Fraktionen für keine Hämoblastose geklärt sind und man für die Mehrzahl der Fälle eine Störung des Mikrovon-
 uments dieser Fraktionen ganz allgemein durch die pathologische überwuchernde Zellfraktion annehmen muß (66).

5.3 Lymphogranulomatose (Hodgkin-Stadium) und Lymphogranulomatose

Die Lymphogranulomatose ist eine maligne Erkrankung, wofür insbesondere der tödliche Verlauf spricht. Im Gegensatz zu Tumoren beherbergt allerdings das pathologische Gewebe des Morbus Hodgkin keine einheitliche Tumorzellrasse. Vielmehr findet sich ein buntes Gemisch von lymphatischen, retikuloendothelialen und granulocytären Zellen. Klinisch steht oft ein schubweiser Verlauf im Vordergrund, einhergehend mit Fieber, Granulozytose, Monozytose, Lymphopenie, Senkungsbeschleunigung, Vermehrung der Alpha- und Gammaglobuline und anderem. So gleicht das Krankheitsbild einer persistierenden Entzündung. Schon 1953 schrieb Begemann (9): "Diese Krankheit nimmt eine eigenartige Zwischenstellung zwischen Infektion und Tumor ein und erscheint als eine permanente Weiterentwicklung und Steigerung der für die reaktive Lymphknotenhyperplasie typischen zytologischen Veränderungen."

Eine maligne Neoplasie kann als autonomer Wachstumsprozeß definiert werden, der unbehandelt zum Tode des Trägers führt (86). Als Neubildungsprozeß ist die Neoplasie durch Expansion einer neoplastischen Zellpopulation gekennzeichnet (173, 174, 191). Diese Geschwulstzellexpansion erfolgt nicht nur am Entstehungsort der Neoplasie, sondern setzt sich in das benachbarte normale Gewebe (Invasion, Infiltration) und in entfernte Organe (Metastasierung) fort. Eine Entzündungssymptomatik gehört nicht zum typischen Bild maligner Neoplasien. Die Erfolge der Strahlen- und Zytostatikatherapie sind bei neoplastischen Erkrankungen von wenigen Ausnahmen abgesehen gering.

Die Metastasierung als typisches Merkmal maligner Neoplasien kann bei der Definition des pathophysiologischen Charakters der Lymphogranulomatose nicht herangezogen werden, da Zellausschwemmung auf dem Lymph- oder Blutweg und Zellansiedlung in entfernten Geweben bereits physiologische Erscheinungen des lymphatischen Zellsystems darstellen (76, 84). Zur Infiltration benachbarter Gewebe kommt es beim Morbus Hodgkin im Gegensatz zu Neoplasien, wo diese ein Frühsymptom darstellt, erst in späten Stadien (108, 130).

Nun könnte die fehlende Parallelität von Lymphogranulomatose und klassischer Neoplasie - z.B. Carcinom - dadurch bedingt sein, daß Geschwülste der Epithelien und des lymphatischen Zellsystems grundsätzlich nicht vergleichbar sind. Schick und Trepel (218) vergleichen daher die Lymphogranulomatose mit Neoplasien des lymphatischen Systems, den Nicht-Hodgkin-Lymphomen.

Von diesen unterscheidet sich die Lymphogranulomatose erstens durch die meist erheblich geringere Progredienz des Krankheitsprozesses. Zweitens findet sich, wenn man vom Hodgkin-Sarkom absieht, keine einheitliche Tumorzellpopulation, sondern vielmehr ein buntes histologisches Bild. Es dominieren morphologisch normale Lymphozyten und große lymphoide Zellen. Daneben finden sich reichlich Histiozyten und Granulozyten. Einkernige Hodgkin-Zellen und Mehrkernige Sternbergsche Riesenzellen machen in den meisten Fällen weniger als 5 % der Zellpopulation aus (218). Lediglich beim Hodgkin-Sarkom (103, 104) findet sich ein klassisches Neoplasiebild mit Vorherrschen der Hodgkin-Zelle. In Spätstadien dieser Art proliferieren die Hodgkin-Zellen wie neoplastische Zellen monoklonal und permanent (14).

Darüber hinaus finden sich in den meisten Fällen beim Morbus Hodgkin in Form der Granulome - die Krankheit wird deshalb ja auch als Lymphogranulomatose bezeichnet - Gewebsmanifestationen, wie sie für die chronischen Entzündungen charakteristisch sind (127). Zudem unterscheidet sich die Lymphogranulomatose auch durch die großen Erfolge der Strahlen- und Zytostatikatherapie besonders von den stark malignen Nicht-Hodgkin-Lymphomen - z.B. Retikulosarkom und Lymphosarkom. Während die Therapieerfolge bei diesen Erkrankungen außerordentlich gering sind (106), kann man heute davon ausgehen, daß etwa 50 % aller neu erkrankten Hodgkin-Patienten bei Behandlung in spezialisierten Zentren eine Heilungschance haben oder zumindest eine rezidivfreie Remission von mehr als 10 Jahren Dauer erwarten können (2, 108).

In übrigen finden sich große Übereinstimmungen zwischen dem Morbus Hodgkin und nichtneoplastischen lymphoproliferativen Erkrankungen, der infektiösen Mononukleose, die durch das Epstein-Barr-Virus ausgelöst wird, und der immunoblastischen Lymphadenopathie, die zwar oft maligne verläuft, aber dem hyperplastischen Formenkreis zuzuordnen ist (69, 132, 161). Alle drei Erkrankungen befallen neben den Lymphknoten die Milz, die Leber und andere Organe (69, 132, 161). In den erkrankten lymphatischen Organen finden sich heterogene Zellpopulationen. Es kommen alle Formen der lymphatischen und der Plasmazellreihe mit prominenten Immunoblasten vor (30, 141, 211). Mehrkernige Riesenzellen, morphologisch analog den Sternbergzellen der Lymphogranulomatose, finden sich auch bei der infektiösen Mononukleose (1, 211). Bei der immunoblastischen Lymphadenopathie und bei der Lymphogranulomatose finden sich oft reichlich eosinophile

Granulozyten. In fortgeschrittenen Stadien dieser Erkrankung sind die kleinen Lymphozyten wie beim Morbus Hodgkin vermindert (69, 132, 161).

Meist ist bei allen drei Erkrankungen die Struktur der befallenen Lymphknoten so zerstört, daß die Aufteilung in äußere Rinde, Parakortikalregion und Mark nicht mehr erkennbar ist (30, 69, 132, 161, 211). Zentrum der pathologischen Veränderungen in den Lymphknoten scheint die Parakortikalregion, d.h. die T-Zell-Region, zu sein (30, 131). Defekte der zellulären Immunität, deren Träger die T-Zellen sind, bestehen, wie auch unsere eigenen Untersuchungen zeigen, beim Morbus Hodgkin und bei der Mononukleose (30, 133).

Abgesehen von der wahrscheinlich verschiedenen Ätiologie scheint der wesentliche Unterschied zwischen Mononukleose und immunoblastischer Lymphadenopathie auf der einen und der Lymphogranulomatose auf der anderen Seite im chronischen Verlauf und der eindeutigen Malignität des Morbus Hodgkin gegenüber dem akuten Verlauf und der relativen bis absoluten Benignität der beiden anderen Erkrankungen zu liegen. Diese beiden Erkrankungen werden als Immunreaktion, im Fall der infektiösen Mononukleose auf das Epstein-Barr-Virus und dessen induzierte Zellveränderungen (30) und im Falle der immunoblastischen Lymphadenopathie auf noch unbekannte Antigene gedeutet (175, 161). Entsprechend könnte es sich auch beim Morbus Hodgkin um eine Immunreaktion handeln.

Eine Immunreaktion ist definiert als die auf einen Reiz hin erfolgende Aktivierung von immunkompetenten Lymphozyten zu immunologischen Effektorzellen. Die spezifische

Immunreaktion wird durch Antigene ausgelöst, wobei die entstehenden T-Effektorzellen spezifischen zytotoxischen Kontakt mit dem Antigen aufnehmen und die spezifischen B-Effektorzellen spezifische Antikörper sezernieren (216). Die unspezifische Immunreaktion wird dagegen durch nicht antigene Reize hervorgerufen, wobei die entstehenden Effektorzellen Zytotoxizitäten und Antikörper entwickeln, die keine Beziehung zum aktivierenden Mitogen besitzen (6, 216). Nach Verschwinden des Reizes erlischt die Immunreaktion. Persistiert der Reiz für längere Zeit, so werden ständig neue immunkompetente Zellen aktiviert.

Die frühesten Gewebsmanifestationen des Morbus Hodgkin unterscheiden sich kaum von normalen immunologisch stimulierten lymphatischen Geweben (124, 192, 201). Eine gesteigerte Produktion großer und kleiner Lymphozyten begleitet die Immunreaktion und den Morbus Hodgkin (178, 179). Große proliferierende lymphoide Zellen werden in beiden Fällen in efferente Lymphe und Blut ausgeschwemmt (218). In beiden Fällen werden T-Zellen aktiviert (99, 134, 195, 197). Im Verlauf der Immunreaktion auf die meisten Antigene treten T-Effektorzellen und spezifische Antikörper von B-Effektorzellen auf (102, 216). Einige Befunde sprechen für ähnliche Vorgänge beim Morbus Hodgkin. Da jedoch das Agens, das die Lymphozytenproliferation beim Morbus Hodgkin auslöst, nicht bekannt ist, ist derzeit die Spezifität der antilymphozytären Antikörper der Hodgkin-Patienten nicht zu beweisen (81, 82, 107, 129).

Der entscheidende Unterschied zwischen der physiologischen Immunreaktion und der Lymphogranulomatose dürfte

in der Rolle des Antigens liegen. Dieses provoziert durch sein Erscheinen die Immunreaktion und beendet sie durch sein Verschwinden (102, 216). Dagegen findet sich beim Morbus Hodgkin eine permanente Stimulation des lymphatischen Zellsystems. Ob es sich um eine spezifische Immunreaktion oder um eine unspezifische Aktivierung durch ein pathogenes Agens handelt, ist nicht sicher. Sicher ist dagegen, daß die Reaktion des lymphatischen Zellsystems bei der Lymphogranulomatose im Gegensatz zur normalen Immunreaktion nicht selbstlimitiert und deshalb atypisch ist (218).

Lymphozytenfunktionsstörungen der verschiedensten Art sind ein wichtiges Charakteristikum der Lymphogranulomatose. Sie sind vor allem in fortgeschrittenen Stadien nachweisbar. Die in diesen Stadien deutliche Lymphopenie korreliert mit einer starken Vermehrung von Blutlymphozyten in DNS-Synthese (97). Dies spricht für eine erhöhte Neubildungsrate (97, 176). Die Lymphopenie bei gesteigerter Proliferation - in erster Linie der T-Lymphozyten (99) - ist durch eine verkürzte Lebensdauer zirkulierender Lymphozyten bedingt. Wir konnten im Rahmen unserer Untersuchungen feststellen, daß bei der Lymphogranulomatose wenn auch in weniger starkem Ausmaß als bei der CLL die Anzahl kurzlebiger T-Zellen gegenüber Normalwerten deutlich erhöht war (s.4.6).

Wie andere (25, 89) konnten auch wir im Rahmen unserer Untersuchungen zeigen, daß die Blastentransformation der Blutlymphozyten in Gegenwart von PHA beim Morbus Hodgkin eingeschränkt ist (s.oben). Dies gilt insbesondere für die Stadien III und IV, kann jedoch auch bei Frühfällen nachweisbar sein. Dabei kann das Ausmaß der Transformation so stark vermindert sein wie bei der chronischen Lymphadenose (s.4.2 und 4.3).

Diese Beobachtungen korrelieren mit den Störungen der allergischen Hautreaktion vom verzögerten Typ. In Frühstadien der Erkrankung ist die Reaktionsfähigkeit weitgehend normal, während sich in den Stadien III und IV meist pathologische Testergebnisse im Sinne einer Anergie finden (25). In diesen Stadien fanden wir meistens drastisch erniedrigte T-Zellzahlen als Ausdruck einer schweren Störung der zellulären Immunität (s.4.5).

Patienten mit Anergie zeigen eine signifikant niedrigere Reaktionsfähigkeit gegen PHA in der Lymphozytenkultur als solche mit erhaltener Hautreaktion. Interstitielle Pneumonien und andere Komplikationen, die durch normalerweise wenig pathogene Erreger bedingt sind, wie Pneumozystis carini, Zytomegalievirus, Candida und andere, sind bei Lymphogranulomatosepatienten fast immer von ausgeprägten Einschränkungen der PHA-Reaktionsfähigkeit begleitet.

Neben dem histologischen Bild ist die Lymphogranulomatose durch ein enges Nebeneinander von "neoplastischen" Zellen und entzündlicher Reaktion gekennzeichnet. Schon seit längerer Zeit wird auf Ähnlichkeiten zwischen dem Morbus Hodgkin und der Graft-versus-host-Reaktion hingewiesen (1). Die Lymphogranulomatose könnte demnach als lymphatische "Neoplasie" und durch das Vorhandensein "tumor-assoziierten" Antigene und einer gegen diese gerichteten Abwehrreaktion gekennzeichnet sein. Dafür spricht einiges. So wurde auf zellassoziierte Antigene beim Morbus Hodgkin hingewiesen, deren Charakterisierung sehr wesentlich zum Verständnis der Erkrankung beitragen dürfte (148). Die Bildung von Immunglobulinen mit der Fähigkeit, sich an Patientenlymphozyten oder normale Lymphozyten zu binden,

konnte in Zellsuspensionen aus der Milz von Hodgkin-Patienten festgestellt werden und könnte auf die Bildung anti-lymphozytärer Antikörper hinweisen (129).

Der erwähnte gesteigerte Umsatz ist wohl als Verbrauch zirkulierender Lymphozyten im Verlauf von Abwehrreaktionen zu deuten (99). In Frühstadien der Erkrankung soll dabei das Gleichgewicht zwischen pathologischem Geschehen und Reaktion auf Seiten der Abwehr liegen. Bei den meist rasch tödlich verlaufenden lymphozytenarmen Formen gewinnt dabei der pathologische Prozeß schnell die Oberhand.

Longmire und andere (129) fanden wie ausgeführt bei Milzlymphozyten von Hodgkin-Patienten eine gesteigerte IgG-Produktion. Dieses von den Milzlymphozyten produzierte IgG besitzt Spezifität gegen homologe Lymphozyten aus dem Blut von Normalpersonen. Das von normalen Milzlymphozyten produzierte IgG besitzt diese Spezifität nicht.

Es wird vermutet, daß sich diese IgG-Spezifität gegen T-Lymphozyten richtet (54). Es scheint also eine Überreaktivität der B-Lymphozyten zu bestehen, die sich wahrscheinlich gegen veränderte Strukturen der T-Zellen richtet. Order und Hellman (148) haben auf der Basis dieser Beobachtung eine Hypothese über die Entstehung der Lymphogranulomatose angeboten.

Möglicherweise werden T-Zellen durch ein Virus infiziert und verändern auf diese Weise ihre Oberflächeneigenschaften. Sie haben damit antigenen Charakter erhalten und werden vom körpereigenen Immunsystem wie Allotransplantation behandelt.

Normale T-Zellen reagieren dann gegen diese veränderten T-Zellen und diese T-Zellinteraktion, die praktisch einer graft-versus-host-Reaktion entspricht, führt zur Produktion maligner Zellreihen. Dies führt schließlich zur Zerstörung von T-Zellen und damit zu einer Verminderung der T-Zellzahl, wie wir sie in unseren Untersuchungen beobachten konnten. Einmal resultiert also die Proliferation pathologischer Zellreihen. Zum anderen kommt es durch Verminderung der T-Zellzahl sowie durch Veränderung von Oberflächeneigenschaften von T-Zellen, die vielleicht durch Viren bedingt sind, zu einer Störung des T-Systems und damit der zellulären Immunität, die mehr und mehr die Charakteristika einer totalen Anergie annimmt.

Dieser These ist allerdings entgegenzuhalten, daß bislang keine T-Zellhyperaktivität im Rahmen der Lymphogranulomatose nachgewiesen ist. Vielmehr besteht wie ausgeführt ganz im Gegenteil eine Überreaktivität des B-Zellsystems. Wenn wir davon ausgehen, daß die primär geschädigte Zelle bei der Lymphogranulomatose eine in ihren Antigeneigenschaften - durch Virusinfektion oder aber ganz andere derzeit nicht näher zu definierende pathomechanische Faktoren - veränderte T-Zelle ist, wäre dann eine B-zelluläre Immunantwort auf diese als Allotransplantat wirkende Zelle anzunehmen. Die vom B-System produzierten Anti-T-Antikörper besitzen dann möglicherweise Kreuzspezifität sowohl gegen pathologisch veränderte als auch gegen normale T-Zellen.

Dies korreliert gut mit der von uns gemachten Beobachtung, daß auch schon in Stadien, in denen eine Verminderung der T-Zellzahl nicht nachweisbar ist, die

PHA-Reaktivität der Lymphozyten in vitro deutlich eingeschränkt ist. Klinischer Ausdruck ist eine Veränderung der verzögerten Immunantwort im Sinne einer Anergie. Somit ist die Prognose eines Patienten mit annähernd normaler Tuberkulinreaktion günstig, während mit zunehmender Störung dieser Reaktion eine deutliche Verschlechterung der Prognose zu verzeichnen ist. Die Veränderung der Immunantwort vom verzögerten Typ liefert also klinisch einen Hinweis auf die Malignität des Prozesses.

Im Gegensatz zur CLL als B-Zelleukämie handelt es sich bei der Lymphogranulomatose um eine Erkrankung des T-Zellsystems. Ein pathomechanisches Agens - sei es ein Virus oder aber ein anderer, derzeit nicht näher zu definierender Faktor - greift die T-Lymphozyten an und führt bei einem Teil von ihnen zu Alterationen. Diese veränderten T-Zellen sind sehr wahrscheinlich die Mutterzellen der die Lymphogranulomatose prägenden mononukleären Hodgkin-Zellen und der aus ihnen hervorgehenden Sternbergschen Riesenzellen.

Verändert werden wohl vor allem die Oberflächeneigenschaften der betroffenen T-Zellen, die immunologisch ziemlich sicher afunktionell sind. Dafür spricht die in unseren Untersuchungen gemachte Beobachtung verminderter Blastenproliferation unter PHA auch bei normaler T-Zellzahl (s.4.3).

Aufgrund ihrer veränderten Oberflächeneigenschaften werden diese T-Zellen vom Immunsystem als Fremdkörper identifiziert und lösen eine Abwehrreaktion im Bereich der B-Lymphozyten aus, die hyperreaktiv wahrscheinlich

den IgG-Globulinen zuzurechnende Antikörper produzieren. Der zweite Schritt im Pathomechanismus der Lymphogranulomatose ist demnach eine Immunreaktion.

Diese ist atypisch, d.h. sie limitiert sich nicht selbst wie die normale Immunreaktion, die mit der Vernichtung des auslösenden Agens zum Erliegen kommt. Bei der Lymphogranulomatose gelingt also offensichtlich die Vernichtung des Antigens nicht.

Dies könnte einmal dadurch bedingt sein, daß die veränderten Zellen im Rahmen eines neoplasmatistischen Prozesses der T-Zellreihe entstehen, der sich entsprechend der Neoplasmatheorie eigendynamisch aus sich selbst heraus unterhält und letztlich die Oberhand über die gegen ihn gerichteten Abwehrreaktionen gewinnt. Nun ist aber aufgrund neuerer Erkenntnisse die Lymphogranulomatose wahrscheinlich kein neoplasmatistischer Prozeß sui generis.

Wegen der großen Ähnlichkeit mit der infektiösen Mononukleose kommt zweitens ein Virus als auslösende Ursache in Frage. Da die ablaufenden Immunreaktionen ziemlich sicher gegen die veränderten T-Zellen gerichtet sind, ist dieses Virus für sich allein möglicherweise gar nicht antigen wirksam. Es müßte sich dann wie ein Hapten verhalten und würde erst nach Infektion und Alteration der T-Zelle in Kombination mit dieser als vollantigen wirksam. Dieses Verhalten würde die Ausbreitung des infektiösen Agens begünstigen, da es frei das Immunsystem des Organismus unterläuft. Dies würde auch die Insuffizienz der Immunreaktion erklären, da nur die befallenen Zellen nicht aber die aus ihnen frei werdenden Agentien angegriffen werden können. Da

aus einem Virus nach Zellbefall stets zahlreiche neue hervorgehen, wäre auf diese Weise auch der letztlich maligne Verlauf der Erkrankung zu erklären. Andererseits stützen wie ausgeführt gerade die guten Therapieerfolge beim Morbus Hodgkin ebenfalls diese These.

Mit unserem heutigen Wissensstand kann freilich weder die Neoplasmathese eindeutig widerlegt noch die These vom Morbus Hodgkin als Infektionskrankheit belegt werden. Somit ist die eigentliche Ursache der Erkrankung, wenn auch die entzündliche Genese wahrscheinlich ist, letztlich weiterhin unklar. Relativ sicher ist lediglich die atypische Immunreaktion, um mit De Vita (54) zu sprechen, der lymphozytäre Bürgerkrieg, der zwischen B- und T-Lymphozyten nach Auftreten veränderter T-Zellen losbricht.

Die von den B-Zellen produzierten, wahrscheinlich den IgG-Globulinen zuzurechnenden Antikörper gegen die pathologisch veränderten T-Lymphozyten besitzen wohl Kreuzspezifität und greifen zusätzlich auch nicht veränderte T-Zellen an. Dies führt durch T-Zellzerstörung zu einer Verminderung der T-Zellzahl und schließlich zu einer Lymphopenie, wie wir in unseren Untersuchungen zeigen konnten.

Die bereits durch den Ausfall immunologisch afunktionaler, veränderter T-Zellen eingeschränkte zelluläre Immunität wird durch die zusätzliche Zerstörung nicht veränderter T-Zellen bezüglich ihrer Reaktionslage durch zunehmende Anergie gekennzeichnet. Im vermehrten Auftreten kurzlebiger T-Zellen ist wohl ein mehr oder weniger erfolgloser Kompensationsmechanismus des Organismus zu sehen (s.4.6).

Bei der Lymphogranulomatose nicht selten zu beobachten-
de andere Autoimmunphänomene sind wahrscheinlich auf
Kreuzspezifität der Anti-T-Antikörper gegen andere
zelluläre Elemente des Blutes zurückzuführen.

Es wird jetzt auch verständlich, warum die lymphozyten-
reiche Form der Erkrankung prognostisch relativ günstig
ist, während die sogenannte lymphozytenarme Form, das
Hodgkin-Sarkom, sich durch eine schlechte Prognose aus-
zeichnet. Im ersten Fall finden sich neben reichlich
Lymphozyten nur wenige Hodgkin- und Sternbergzellen.
Dies ist ein ziemlich sicheres Zeichen dafür, daß nur
ein geringer Teil der T-Zellen im Sinne der Grundkrank-
heit verändert ist. Somit dürften die B-zellulären Ab-
wehrmechanismen relativ erfolgreich und die Schädigung
der normalen T-Zellen durch die immunologischen Reaktionen
so gering sein, daß die Verluste durch den Kompensations-
mechanismus der Mehrproduktion kurzlebiger T-Zellen re-
lativ vollständig wieder ausgeglichen werden können.

Die Zytologie des Hodgkin-Sarkoms mit dem Vorherrschen
der Hodgkin- und Sternbergzellen bei Lymphozytopenie
spricht für einen hohen Grad von Entartung eines Groß-
teils der T-Zellen. Dies verurteilt die B-zellulären
Immunmechanismen zur Erfolglosigkeit und ihr einziger
Effekt ist die weitgehende Vernichtung noch vorhandener
normaler T-Zellen, so daß es zu einem völligen Zusammen-
bruch der zellulären Immunität kommt. Die Dekompensation
des Immunsystems ist vollständig. Patienten mit Hodgkin-
Sarkom sterben denn meist auch im Verlauf von zwei Jahren
nach Diagnosestellung bei aneurer zellulärer Reaktions-
lage an interkurrenten, für den Normalpatienten harm-
losen Virusinfektionen.

6. Zusammenfassung

Wir untersuchten zwei Normalpatienten, drei Lymphogranulomatosepatienten und fünf Patienten mit chronischer Lymphadenose. Bei allen Patienten wurde wie beschrieben in vivo eine Markierung mit ^3H -Thymidin vorgenommen. Anschließend wurden Lymphozytenkulturen angelegt, denen PHA zugesetzt wurde. Die durch Zytozentrifugation gewonnenen morphologischen Präparate wurden nach Autoradiographie mikroskopisch ausgewertet.

Durch PHA-Zusatz zur Kultur gelang die Demaskierung der T-Zellen, da nur T-Zellen in vitro auf PHA mit Blastenbildung reagieren. Weil nahezu ausschließlieÙlich kleine Lymphozyten sich zu Blasten umsetzten, während mittlere und große Lymphozyten kaum am Umsatz teilnahmen, konnten wir zeigen, daÙ T-Zellen vorzugsweise kleine Lymphozyten sind, während die B-Zellen die große Mehrzahl der mittleren und großen Lymphozyten stellen. Daneben gibt es allerdings auch kleine B-Zellen.

Die PHA-abhängige Blastentransformation erfolgt unseren Beobachtungen entsprechend bei Normalpatienten und beim Morbus Hodgkin vor allem an den Kulturtagen 3 und 4, während sie bei der chronischen Lymphadenose unter Bildung eines ersten Blastengipfels zwar ebenfalls an diesen Terminen beginnt, sich dann aber bis zum Kulturrende fortsetzt, wo sich an den Kulturtagen 7 und 8 ein zweiter Spättransformationsgipfel findet.

Der Erfolg der Blastopoese war bei Normalpatienten mit 40 % am größten, lag bei der Lymphogranulomatose bei 22 % und war bei der chronischen Lymphadenose mit 18 % am geringsten.

Wie beschrieben errechneten wir die Größe des T-Zellcompartiments im peripheren Blut. Dabei fanden wir, daß bei der chronischen Lymphadenose seine relative Größe direkt proportional der Malignität des Krankheitsprozesses mehr und mehr abnimmt, was sich auch in der zunehmend geringeren Blastentransformation in der Kultur niederschlägt. Absolut dagegen vergrößert sich das T-Zellcompartment im Vergleich zu Normalpatienten im Verlauf des Krankheitsprozesses. Bei der Lymphogranulomatose dagegen ist das T-Zellcompartment sowohl relativ als auch absolut kleiner als bei Normalpatienten. Der gegenüber Normalpatienten deutlich geringere Erfolg der Blastopoese auch bei verhältnismäßig normalen T-Zellzahlen erklärt sich durch den im T-Compartment ablaufenden Krankheitsprozeß, wobei die betroffenen Zellen immunologisch afunktionell sind.

Immunkinetisch konnten wir feststellen, daß sich bei Normalpatienten neu gebildete, kurzlebige T-Zellen in etwa gleichem Ausmaß zu Blasten umsetzen wie langlebige T-Lymphozyten. Bei der Lymphogranulomatose dagegen und in noch stärkerem Ausmaß bei der CLL ist der Anteil kurzlebiger T-Zellen am Umsatz deutlich erhöht. Daraus folgt, daß bei beiden Krankheitsbildern vermehrt kurzlebige T-Zellen auftreten. Dabei sind die Proportionen innerhalb des T-Compartiments bei der chronischen Lymphadenose noch deutlicher zu Gunsten der kurzlebigen Zellen verschoben als bei der Lymphogranulomatose.

Wie in der Diskussion ausgeführt, läßt sich bei der chronischen Lymphadenose, die ja eine B-Zelleukämie ist, in einer gesteigerten Proliferation kurzlebiger B-Zellen eine Reaktion auf die Entwicklung der in ihren Antigen-

eigenschaften veränderten pathologischen B-Zellen im Sinne eines Suppressormechanismus sehen. In normaler Konzentration stimulieren sensibilisierte und dadurch kurzlebige T-Zellen über Lymphokine die T-Zellreaktion. Bei erniedrigter Konzentration jedoch - Ausdruck ist die relative Verminderung der T-Zellzahl - kommt es zur Suppression der Reaktion. Im Falle der Suppressorreaktion kommt es so zur Antisuppressorwirkung mit der Folge der unbehinderten Entfaltung der Zielzelle, also der pathologischen CLL-B-Population.

Bei der Lymphogranulomatose dürfte das vermehrte Auftreten kurzlebiger T-Zellen als Kompensationsmechanismus des Organismus zu erklären sein. Da sich der pathologische Prozeß hier im T-Zellsystem abspielt und im Rahmen der beschriebenen atypischen Immunreaktion nicht nur pathologisch veränderte sondern durch Kreuzimmunität auch normale T-Zellen zugrundegehen, versucht der Organismus durch Neuproduktion - 90 % aller neu gebildeten Lymphozyten sind bekanntlich kurzlebig - diese Verluste auszugleichen. Dies gelingt umso schlechter, je stärker ausgeprägt der Krankheitsprozeß und damit die gegen ihn gerichteten Immunreaktionen sind, so daß es schließlich zur völligen Dekompensation des T-Zellsystems und damit der zellulären Immunität kommt.

7. Literaturverzeichnis

1. AGLIOZZO, C.M., REINGOLD, J.M.: Infectious mononucleosis stimulating Hodgkin's disease. A patient with Reed-Sternberg cells. *Amer. J. clin. Path.* 56, 730 (1972).
2. AISENBERG, A.C.: Malignant lymphoma. *New Engl. J. Med.* 288, 883 und 941 (1973).
3. ALEXOPOULOS, C., BABITIS, P.: Age dependence of T-lymphocytes. *Lancet* I, 426 (1976).
4. ALLISON, A.C., MALLUCCI, L.: Lysosomes in dividing cells with special reference to lymphocytes. *Lancet* II, 1371 (1964).
5. ALLISON, A.C.: Unresponsiveness to self antigen. *Lancet* I, 1401 (1971).
6. ANDERSSON, J., SJÖBERG, O., MÖLLER, G.: Mitogens as probes for immunocyte activation and cellular cooperation. *Transplant. Rev.* 11, 131 (1972).
7. ASKONAS, B.A., AUZINS, J., UNANUE, E.R.: Role of macrophages in the immune response. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1113 (1968).
8. BASH, J.A., DURKIN, H.G., WAKSMAN, H.: Kinetic study of T-lymphocytes after sensitization against soluble antigen. III. Potentiation and suppression of the PHA response by antigen activated lymphocytes of low density. *J. Exp. Med.* 142, 1017 (1975).

9. BEGEMANN, H.: Klinische und experimentelle Beobachtungen an immunisierten Lymphknoten. Schulz, Freiburg (1953).
10. BEKKUM, D.W. van: Use and abuse of hemopoietic cell grafts in immune deficiency diseases. Transplant. Rev. 9, 3 (1972).
11. BERKE, G., AMOS, D.B.: Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. The LMC cycle and its role in transplantation immunity. Transplant. Rev. 17, 71 (1973).
12. BERNARD, C., GERALDES, A., BOIRON, M.: Effects of phytohaemagglutinin on blood cultures of chronic lymphocytic leukaemia. Lancet I, 667 (1964).
13. BIBERFELD, P.: Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohemagglutinin (PHA). A light and electron microscopic study. Acta path. mikrobiol. scand., Section A, Suppl. 223, 1971 a.
14. BOECKER, W.R., HOSSFELD, D.K., GALLMEIER, W.M., SCHMIDT, C.G.: Clonal growth of Hodgkin cells. Nature (London) 258, 235 (1975).
15. BOSMA, M.J., MAKINODAN, T., WALBURG, H.E.: Development of immunological competence in germ free and conventional mice. J. Immunol. 99, 420 (1967).
16. BRAHIM, F., OSMOND, D.G.: Migration of bone marrow lymphocytes demonstrated by selective bone marrow labeling with thymidine-³H. Anat. Rec. 168, 139 (1970).

17. BREMER, K., FLIEDNER, T.M.: Neuere Gesichtspunkte zur Kinetik von Lymphocytenpopulationen. In: Leukämien und maligne Lymphome (Ed. Stacher, A.) Urban und Schwarzenberg, München - Berlin - Wien, 202 (1973).
18. BREMER, K., FLIEDNER, T.M., SCHICK, P.: Kinetik differences of autotransfused ^3H -cytidine labeled blood lymphocytes in leukemic and non-leukemic lymphoma patients. Europ. J. Cancer 9, 113 (1973).
19. BRETSCHER, P.A., COHN, M.: Minimal model for the mechanism of antibody induction and paralysis by antigen. Nature 220, 444 (1968).
20. BRITTINGER, G., KÖNIG, E., ABERLE, H.G., ZIMMERSCHITT, E.: Lysosomale Enzyme in Blutlymphozyten von gesunden und Patienten mit chronischer Lymphadenose bei kurzdauernder unspezifischer Stimulation in vitro. Schweiz. med. Wschr. 100, 341 (1970).
21. BRITTINGER, G., KÖNIG, E., JOHNNEN, G., ABERLE, H.G.: Lysosomale Enzyme in Lymphozyten. I. Lymphoretikuläre Erkrankungen: Vergleich des Enzymgehaltes (saure Phosphatase, Beta-Glucuronidase) unstimulierter Blutlymphozyten mit der Blastentransformation nach Phytohämagglutinin-Stimulierung in vitro. Acta Haemat. 44, 205 (1970).
22. BRITTINGER, G.: Die Lymphozytenkultur als in-vitro-Modell immunologischer Vorgänge. In: Der Lymphozyt (Ed. Pietschmann, H.) Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien, 297 (1972).

23. BRITTINGER, G., AUGENER, W., BREMER, K., COHNEN, G., DABAG, S., FISCHER, K., KÖNIG, E., MEUSERS, P.: Der Lymphozyt bei der chronischen lymphatischen Leukämie. Blut 5, 293 (1975).
24. BRITTINGER, G., BARTELS, H., BREMER, K., DÜHMKE, E., FUNLER, U., KÖNIG, E., STEIN, H.: Klinik der malignen Non-Hodgkin-Lymphome entsprechend der Kieler Klassifikation: Centrocytisches Lymphom, centroblastisch-centrocytisches Lymphom, lymphoblastisches Lymphom, immunoblastisches Lymphom. In: Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien (Ed. Löffler, H.) J. F. Lehmanns Verlag, München, 221 (1976).
25. BROWN, R.S., HAYNES, H.A., FOLEY, H.T., GODWIN, H.A., BERARD, C.W., CARBONE, P.P.: Hodgkin's disease. Immunologic, clinical and histologic features of 50 untreated patients. Ann. intern. Med. 67, 291 (1967).
26. BUCKTON, K.E., SMITH, P.G., COURT-BROWN, W.M.: The estimation of lymphocyte lifespan from studies on males treated with X-rays for ankylosing spondylitis. In: Human Radiation cytogenetics (Ed. Evans, H.J., Court-Brown, W.M., McLean, A.S.) Amsterdam: North Holland 106 (1967).
27. BURNET, F.M.: Immunological Surveillance. Oxford: Pergamon Press (1970).
28. BURNET, F.M.: The concept of immunological surveillance. (Ed. Schwartz, R.S.). Progr. exp. Tumor res. 13, 1 (1970).

29. CAROSELLA, E.D., MOCHANKO, K., BRAUN, M.: Rosette-forming T-cells in human peripheral blood at different ages. *Cellular Immunol.* 12, 323 (1974).
30. CARTER, R.L.: Infectious mononucleosis: Model for self-limiting lymphoproliferation. *Lancet* I, 846 (1975).
31. CATOVSKY, D., MILLANJ, E., OKOS, A., GALTON, D. A.G.: Clinical significance of T-cells in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* II, 751 (1974).
32. CHANANA, A.D., CRONKITE, E.F., JOEL, D.D., WILLIAMS, R.M., WAKSMAN, B.H.: Migration of thymic lymphocytes: Immunofluorescence and ^3H -TdR labeling studies. In: *Morphological and Functional Aspects of Immunity* (Ed. Lindahl-Kiessling, K., Alm, G., Hanna, M.G. jr.) Plenum Press, New York - London, 113 (1971).
33. CLAESSON, M.H.: Quantitative studies on the normal decay of lymphocytes in the thymolymphatic system. *Scand. J. Haemat.* 6, 87 (1969).
34. CLAMAN, H.D., MOSIER, B.E.: Cell-interactions in antibody-production. *Progr. Allergy* 16, 40 (1972).
35. CLEAVER, J.E.: Thymidine metabolism and cell kinetics. Amsterdam: North Holland (1967).
36. COHN, Z.A., WIENER, E.: The particulate hydrolases of macrophages. I. Comparative enzymology isolation and properties. *J. exp. Med.* 118, 991 (1963); II. Biochemical and morphological response to particle ingestion. *J. exp. Med.* 118, 1009 (1963).

37. COHNEN, G., DOUGLAS, S.D., KÖNIG, E., BREMER, K.,
BRITTINGER, G.: Crystalloid intracytoplasmic
inclusions in lymphocytes of a patient with chronic
lymphocytic leukemia. Mt. Sinai J. Med. 40, 249 (1973).
38. COHNEN, G.: Funktion und Oberflächenmarker mensch-
licher T- und B-Lymphozyten. Dtsch. med. Wschr. 99,
2241 (1974).
39. COHNEN, G.: Klinisch-diagnostische Bedeutung der
Oberflächenmarker menschlicher T- und B-Lymphozyten.
Dtsch. med. Wschr. 99, 2302 (1974).
40. COHNEN, G., AUGENER, W., BUKA, A., BRITTINGER, G.:
Rosette-forming lymphocytes in normals and patients
with malignant lymphomas. Acta Haemat. 51, 63 (1974).
41. COHNEN, G.: T- und B-Lymphozyten bei chronischer
lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose.
In: Veröffentlichungen aus der Pathologie, Heft 97
(Ed. Büngeler, W., Eder, M., Lennert, K., Peters, G.,
Sandritter, W., Seifert, G.) G. Fischer, Stuttgart
(1975).
42. COOPER, H.L., RUBIN, A.D.: RNA metabolism in lympho-
cytes stimulated by phytohemagglutinin: Initial
responses to phytohemagglutinin. Blood 25, 1014 (1965).
43. COOPER, H.L.: Early biochemical events in lymphocyte
transformation and their possible relationship to
growth regulation. In: Proc. Fifth Leukocyte Conf.
1970 (Ed. Harris, J.E.) Academic Press, New York -
London, 15 (1970).

44. CRADDOCK, C.G., LONGMIRE, R., McMILLAN, R.: Lymphocytes and the immun response. *New Engl. J. Med.* 285, 324 und 378 (1971).
45. CRONKITE, E.P., JANSEN, C.R., COTTIER, H., RAI, K.P., GIFF, C.R.: Lymphocyte production measured by extra-corporal irradiation, cannulation and labeling techniques. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 113, 566 (1964).
46. CUNNINGMAN, A.J.: Active suppressor mechanism maintaining tolerance to some self components. *Nature* 254, 143 (1975).
47. DAMESHEK, W.: Chronic lymphocytic leukemia - an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood* 29, 566 (1967).
48. DAVID, J.R.: Lymphocyte mediators and cellular hypersensitivity. *New Engl. J. Med.* 288, 143 (1973).
49. DAVIES, A.J.S., LEUCHARS, E., WALLIS, V., KOLLER, P.C.: The mitotic response of thymus-derived cells to antigenic stimulus. *Transplant. Rev.* 4, 438 (1966).
50. DAVIES, A.J.S.: Thymus and cellular basis of immunity. *Transplant. Rev.* 1, 43 (1969).
51. DAVIES, A.J.S.: Thymic hormones ? In: *Thymus factors in immunity* (Ed. Friedman, H.) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249, 61 (1975).
52. DAVIS, S.: The variable pattern of circulating lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukemia. *New Engl. J. Med.* 294, 1150 (1976).

53. DECKER, J., CLARK, J., MacPHERSON, L., WEINSTEIN, R., SERCARZ, E.B.: Early appearance of antigen binding cells to two different antigens during fetal lymphoid development. In: Microenvironmental Aspects of Immunity (Ed. Jankovic, B.D., Isakovic, K.) Plenum Press, New York - London, 269 (1973).
54. DE VITA, V.T. jr.: Lymphocyte reactivity in Hodgkin's disease. A lymphocyte civil war. *New Engl. J. Med.* 289, 801 (1973).
55. DIAZ-JOUANEN, E., STRICKLAND, R. G., WILLIAMS, R.C.: Studies of human lymphocytes in the new born and the aged. *Am. J. Med.* 58, 620 (1975).
56. DICKIE, K.A., NOORD, M.J. van, MAAT, B., SCHAEFER, U.W., BEKKUM, D.W. van: Attempts at morphological identification of the haemopoietic stem cell in primates and rodents. In: Ciba Foundation Symposium 13: Haemopoietic Stem Cells. Amsterdam - London - New York: Elsevier, Excerpta Medica North Holland, 47 (1973).
57. DOUGLAS, S.D.: Human lymphocyte growth in vitro: Morphologic, biochemical and immunologic significance. *Int. Rev. exp. Path.* 10, 41 (1971).
58. EARDLEY, D.D., GERSHON, R.K.: Feedback induction of suppressor T-cell activity. *J. Exp. Med.* 142, 524 (1975).
59. ELVES, M.W.: The biological effects of phytohemagglutinin. *Proc. Symposium. The Charles Salt Research Center* (1966).
60. EVERETT, N.B., TYLER, R.W.: Lymphopoiesis in the thymus and other tissues: Functional implications. *Int. Rev. Cytol.* 22, 205 (1967).

61. FAGRAEUS, A.: Antibody production in relation to the development of plasma cells. *Acta med. scand. Suppl.* 204, 1 (1948).
62. FELDMANN, M., BASTEN, A.: Cell interactions in the immune response in vitro. I. Metabolic activities of T-cells in a collaborative antibody response. *Europ. J. Immunol.* 2, 213 (1972).
63. FELDMANN, M., NORRALL, G.J.V.: Tolerance, enhancement and the regulation of interactions between T-cells, B-cells and macrophages. *Transplant. Rev.* 13, 3 (1972).
64. FIELD, E.O., SHARPE, H.B.A., DAWSON, K.B., ANDERSEN, V., KILLMANN, S.A., WETKE, E.: Turnover rates of normal blood lymphocytes and exchangeable pool size in man, calculated from analyses of chromosomal aberrations sustained during extra corporal irradiation of the blood. *Blood* 39, 39 (1972).
65. FISHER, D.B., MUELLER, G.C.: An early alteration in the phospholipid metabolism of lymphocytes by phytohemagglutinin. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 60, 1396 (1968).
66. FLIEDNER, T.M.: Hämopoetische Stammzellen: Eine Teilpopulation der "Lymphozyten". In: *Lymphozyt und klinische Immunologie* (Ed. Thelml, H., Begemann, H.) Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York, 63 (1975).
67. FOOT, E.C.: Eosinophil turnover in the normal rat. *Brit. J. Haemat.* II, 439 (1965).

68. FORD, W.L., GOWANS, J.L.: The traffic of lymphocytes. *Sem. Hemat.* 6, 67 (1969).
69. TRILETTA, G., MORAN, E.M., RAPAPORT, H.: Angio-immuno-elastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet* I, 1071 (1974).
70. FRÖLAND, S.S.: Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T-lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* 1, 269 (1972).
71. GARDNER, J.D., BLANDEN, R.V.: The cell mediated immune response to Ectromelia virus infection. II. Secondary response in vitro and kinetics of memory T-cell production in vivo. *Cell. Immunol.* 22, 283 (1976).
72. GEHA, R.S., ROSEN, F.S., MERLER, E.: Unresponsiveness of human B-lymphocytes to phytohemagglutinin. *Nature* 248, 426 (1974).
73. GERBER, N.L., STEINBERG, A.D.: Physical separation of "suppressor" from "helper" thymocytes. *J. Immunol.* 115, 1744 (1975).
74. GERSHWIN, M.E., STEINBERG, A.D.: Loss of suppressor function as a cause of lymphoid malignancy. *Lancet* II, 1176 (1973).
75. GOLDBERG, M.L., ROSENAU, W., BURKE, G.C.: Fractionation of phytohemagglutinin. I. Purification of the RNA and DNA synthesis-stimulating substances and evidence that they are not proteins. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 64, 283 (1969).

76. GOWANS, J.L., KNIGHT, E.J.: The route of recirculation of lymphocytes in the rat. *Proc. Roy. Soc. B.* 159, 257 (1964).
77. GOWANS, J.L., MCGREGOR, D.D.: The immunological activities of lymphocytes. *Progr. Allergy* 9, 1 (1969).
78. GREAVES, M., JANOSSY, G.: Elicitation of selective T and B lymphocyte responses by cell surface binding ligands. *Transplant. Rev.* 11, 87 (1972).
79. GREAVES, M., JANOSSY, G., DOWNHOFF, M.: Activation of human T- and B-lymphocytes by polyclonal mitogens. *Nature* 248, 698 (1974).
80. GREY, H.M., RABELLINO, E., PIROWSKY, B.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. IV. Distribution in hypogammaglobulinaemia, cellular immune deficiency and chronic lymphatic leukemia. *J. clin. Invest.* 50, 2368 (1971).
81. GRIFONI, V., DEL GIACCO, G.S., TOGNELLA, J., MANCONI, P.E., MANTOVANI, G.: Lymphocytotoxins in Hodgkin's disease. *Ital. J. Immunol. Immunopath.* 1, 21 (1970).
82. GRIFONI, V.: Recent immunological findings in Hodgkin's disease. *Tumori* 59, 363 (1973).
83. GRUNDMANN, G.: Die Rolle der Lymphozyten bei der Wahrung der individuellen Integrität. In: *Lymphozyt und klinische Immunologie* (Ed. Thelml, H., Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 50 (1975).
84. HALL, J.G.: Effector mechanisms in immunity. *Lancet* I, 25 (1969).

85. HAMILTON, L.D.: Nucleic acid turnover studies in human leukaemic cells and the function of lymphocytes. *Nature* 178, 597 (1956).
86. HAMPERL, H.: Die Morphologie der Tumoren. In: Handbuch der Allgemeinen Pathologie Band IV 3. Teil Geschwülste (Ed. Büchner, F., Letterer, E., Roulet, W.) Springer Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 18 (1956).
87. HARTMANN, K.U.: In vitro studies of cellular cooperation during immune induction. In: The Role of Lymphocytes and Macrophages in the Immunological Response (Ed. Dumonde, D.C.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 22 (1971).
88. HAVEMANN, K., RUBIN, A.D.: The delayed response of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to phytohemagglutinin in vitro. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 127, 668 (1968).
89. HAVEMANN, K., SCHMIDT, M.: Lymphozytenkulturen bei Hodgkin'scher Erkrankung. Hinweise für zwei Lymphozytenpopulationen bei unterschiedlicher Reaktion auf Phytohemagglutinin. *Klin. Wschr.* 46, 31 (1968).
90. HAYWARD, A.R., SOOTHILL, J.F.: Some clinical implications of thymus dependent functions. In: Contemporary topics in immunobiology, Volume 2: Thymus Dependency (Ed. Davies, A.J.S., Carter, R.L.) Plenum Press, New York - London, 351 (1973).
91. HEINE, K.M., STOBBE, H., HOFER, E., WEBER, H.: Lymphozytentransformation bei chronischer lymphatischer Leukose unter Berücksichtigung der absoluten Lymphozytenzahl im Blut. *Acta Haemat.* 41, 144 (1969).

92. HERSEY, P.: The separation and ^{51}Cr labeling of human lymphocytes with in vivo studies of survival and migration. *Blood* 38, 360 (1971).
93. HIRSCHHORN, R., WAFDAN, J. M., CHANDLER, A. P., HIRSCHHORN, I., WEISSMANN, G.: Acid phosphatase-rich granules in human lymphocytes induced by phytohemagglutinin. *Science* 147, 55 (1965).
94. HIRSCHHORN, R., HIRSCHHORN, I., WEISSMANN, G.: Appearance of hydrolase rich granules in human lymphocytes induced by phytohemagglutinin and antigens. *Blood* 30, 84 (1967).
95. HIRSCHHORN, R., BRITTINGER, G., HIRSCHHORN, I., WEISSMANN, G.: Studies on lysosomes. XII. Redistribution of acid hydrolases in human lymphocytes stimulated by phytohemagglutinin. *J. Cell Biol.* 37, 412 (1968).
96. HIRSCHHORN, R., TROLL, W., BRITTINGER, G., WEISSMANN, G.: Template activity of nuclei from stimulated lymphocytes. *Nature* 222, 1247 (1969).
97. HUBER, Ch., HUBER, H., SCHMALZL, F., LEDERER, B., HÜTTRICH, B., BRAUNSTEINER, H.: DNS-synthetisierende Blutlymphozyten beim malignen Lymphogranulom. *Acta Haemat.* 44, 222 (1970).
98. HUBER, Ch., KURZ, R., ASAMER, H., HUBER, H., BRAUNSTEINER, H.: Die Differenzierung menschlicher Blutlymphozyten mit serologischen und autoradiographischen Methoden. *Klin. Wschr.* 52, 127 (1974).

99. HUBER, Ch., MICHELMAYR, G., FALKENSAMMER, M., FINK, U.,
 zur NIEDDEN, G., BRAUNSTEINER, H., HUBER, H.: Increased
 proliferation of T-lymphocytes in the blood of patients
 with Hodgkin's disease. *Clin. exp. Immunol.* 21, 47 (1975).
100. MEIER, H., FARNOULI, Ch., MICHELMAYR, G.: Immunopatho-
 logie lymphatischer Systemerkrankungen. In: *Lymphozyt
 und klinische Immunologie* (Ed. Thiel, H., Begemann, H.)
 Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1975).
101. HUHNS, D., THIEL, E., RODT, H.: Immunglobulin-Ablagerun-
 gen in Lymphadenose-Zellen. *Klin. Wschr.* 53, 317 (1975).
102. HUMPHREY, J.H., WHITE, R.G., MACHER, E.: Kurzes Lehr-
 buch der Immunologie. Thieme Verlag, Stuttgart (1971).
103. JACKSON, H.jr., PARKER, F.jr.: Hodgkin's disease. I.
 General considerations. *New Engl. J. Med.* 230, 1 (1944).
104. JACKSON, H.jr., PARKER, F.jr.: Hodgkin's disease. II.
 Pathology. *New Engl. J. Med.* 231, 35 (1944).
105. JANEWAY, C.A.jr., SHARROW, S.O., SIMPSON, E.: T-cell
 populations with different functions. *Nature* 253,
 544 (1975).
106. JELLIFFE, A.M., MILLET, Y.L.: Chemotherapy and radio-
 therapy in the management of the malignant lymphomas.
 In: *Diagnosis and therapy of malignant lymphomas*
 (Ed. Musshoff, K.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg
 - New York, 182 (1974).
107. JONES, D.B., PAYNE, S.V., SMITH, L., WRIGHT, D.H.:
 Macrophage migration inhibition and immunoglobulin
 production by Hodgkin's disease biopsy specimens in
 vitro. *Brit. J. Cancer* 32, 243 (1975).

108. KAPLAN, H.S.: Hodgkin's disease. Harvard University Press, Cambridge/Mass. (1972).
109. KAY, J.E.: RNA and protein synthesis in lymphocytes incubated with phytohemagglutinin. In: The biological effects of phytohemagglutinin (Ed. Elves, M.W.) The Robert Jones and Agnes Hunt Orthopaedic Hospital Management Committee, Oswestry 37 (1966).
110. KAY, J.E.: Phytohemagglutinin: An early effect on lymphocyte lipid metabolism. *Nature* 219, 172 (1968).
111. KAY, J.E., LEVENHAL, B.G., COOPER, H.L.: Effects of inhibition of ribosomal RNA-synthesis on the stimulation of lymphocytes by phytohemagglutinin. *Exp. Cell Res.* 54, 94 (1969).
112. KILLANDER, D., RIGLER, R.jr.: Initial changes of desoxyribonucleoprotein and synthesis of nucleic acid in phytohemagglutinin-stimulated human leukocytes in vitro. *Exp. Cell Res.* 39, 701 (1965).
113. KILLMANN, S.A.: Acute leukemia. The kinetics of leukemic blast cells in man. An analytical review. *Ser. Haemat.* 1, 38 (1968).
114. KINDRED, J.E.: A quantitative study of the hemopoietic organs of young adult albino rats. *Amer. J. Anat.* 71, 207 (1942).
115. KLEINSMITH, L.J., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E.: Phosphorylation of nuclear protein early in the course of gene activation in lymphocytes. *Science* 154, 780 (1966).

116. KNAPP, W., BOLHUIS, R.L.H., RADL, J., HIJMAN, W.: Independent movement of IgD and IgM molecules on the surface of individual lymphocytes. *J. Immunol.* 111, 1295 (1973).
117. KÜLSCH, E., STUMPF, R., WEBER, G.: Low zone tolerance and suppressor T-cells. In: *Transplantation Reviews* (Ed. Möller, G.) 26 (1975).
118. KÖNIG, E., COHNEN, G., ABERLE, H.G., BRITTINGER, G.: Lysosomale Enzyme in Lymphozyten. II. Chronische lymphatische Leukämie (CLL): Veränderungen des Enzymgehalts (saure Phosphatase, Beta-Glucuronidase) von Blutlymphozyten während einer mehrtägigen Stimulierung mit Phytohämagglutinin in vitro. *Acta Haemat.* 44, 265 (1970).
119. KORNFIELD, R., KORNFIELD, S.: The structure of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 245, 2536 (1970).
120. KORNFIELD, S.: Decreased phytohemagglutinin receptor sites in chronic lymphocytic leukemia. *Biochem. Biophys. Acta* 192, 542 (1969).
121. KORNFIELD, S., KORNFIELD, R.: Solubilization and partial characterization of a phytohemagglutinin receptor site from human erythrocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 63, 1439 (1969).
122. KOTANI, M., YAMASHITA, A., RAY, F., SEIKI, K., HORII, J.: Reutilization of DNA-breakdown products from lymphocytes in lumen of intestine. *Blood* 30, 616 (1967).

123. LAMELIN, J.P., LISOWSKA-BERNSTEIN, B., MATTER, A.,
RYSER, J.E., VASSALLI, P.: Mouse thymus independent
and thymus-derived lymphoid cells. I. Immunofluores-
cent and functional studies. *J. Exp. Med.* 136, 984
(1972).
124. LENNERT, K.: Die Frühveränderungen der Lymphogranulo-
matose. *Frankfurt 2. Path.* 69, 103 (1958).
125. LENNERT, K., MOHRI, N., STEIN, H., KAISERLING, E.:
The histopathology of malignant lymphoma. *Brit. J.*
Hämatol. 31, Suppl. 193 (1975).
126. LENNERT, K.: Klassifikation und Morphologie der
Non-Hodgkin-Lymphome. In: *Maligne Lymphome und*
monoklonale Gammopathien. (Ed. Löffler, H.) J.F.
Lehmanns Verlag, München, 145 (1976).
127. LETTERER, E.: *Allgemeine Pathologie.* VEB Thieme
Verlag, Leipzig (1959).
128. LINNA, T.J., LAM, K.M., HU, C.: Influence of bursa-
dependent immunity on host defence against tumors.
Scand. J. Immunol. 5, 450 (1976).
129. LONGMIRE, R.L., McMILLAN, R., YELENOSKY, R.,
ARMSTRONG, S., LANG, J.E., CRADDOCK, C.G.: In vitro
splenic IgG synthesis in Hodgkin's disease. *New Engl.*
J. Med. 289, 763 (1973).
130. LUKES, R.J., BUTTLER, J., HICKS, E.: Natural history
of Hodgkin's disease as related to its pathologic
picture. *Cancer* 19, 317 (1966).

131. LUKES, R.J., COLLINS, R.D.: Immunologic characterization of human malignant lymphomas. *Cancer* 34, 1488 (1974).
132. LUKES, R.J., TINDLE, B.H.: Immunoblastic lymphadenopathy a hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *New Engl. J. Med.* 292, 1 (1975).
133. MANGI, R.J., NIEDERMAN, J.C., KELLEHER, J.E., DWYER, J.M., EVANS, A.S., KANTOR, F.S.: Depression of cell mediated immunity during acute infectious mononucleosis. *New Engl. J. Med.* 291, 1149 (1974).
134. MATCHETT, K.M., HUANG, A.T., KREMER, W.B.: Impaired lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. Evidence for depletion of circulating T-lymphocytes. *J. clin. Invest.* 52, 1908 (1973).
135. MATSUYAMA, M., WIADROWSKI, M.N., METCALF, D.: Autoradiographic analysis of lymphopoiesis and lymphocyte migration in mice bearing multiple thymus grafts. *J. Exp. Med.* 123, 559 (1966).
136. McINTYRE, O.R., EBAUGH, F.G.jr.: The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P-32-incorporation in the DNA, RNA and acid soluble fractions. *Blood* 19, 445 (1962).
137. McLAUGHLIN, H., WETHERLY-MEIN, G., PITCHER, C., HOBBS, J.R.: Non-immunoglobulin-bearing B-lymphocytes in chronic lymphatic leukaemia? *Brit. J. Haemat.* 25, 7 (1973).
138. MELLSTEDT, H., PETTERSSON, D.: Lymphocyte subpopulation in chronic lymphocytic leukemia. *Scand. J. Immun.* 3, 303 (1974).

139. MENDELSON, J., SKINNER, A.S., KORNFELD, S.: Rapid induction of increased alpha-aminoisobutyric acid uptake by phytohemagglutinin stimulated lymphocytes. Abstr. XIIIth Internat. Congr. Hemat., München, 76 (1970).
140. MICHELMATP, G., HUBER, Ch., FINK, U., FALKENSAXMER, M., HUBER, H.: T-Lymphozyten im peripheren Blut und Lymphknoten bei lymphatischen Systemerkrankungen. Schweiz. med. Wschr. 104, 815 (1974).
141. MOESCHLIN, S.: Die Genese der Drüsenfieberzellen (Mononucleosis infectiosa) anhand von Drüsen-, Sternal- und Milzpunktaten. Dtsch. Arch. klin. Med. 187, 249 (1941).
142. MOHR, R.: Über Funktion von B- und T-Zellen. In: Lymphozyt und klinische Immunologie. (Ed. Thewissen, H., Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 27 (1975).
143. NACHTIGAL, D., ZAN-BAR, I., FELDMAN, M.: The role of specific suppressor T-cells in immune tolerance. In: Transplantation Reviews (Ed. Müller, G.) 26, 87 (1975).
144. NORMAN, A., SASAKI, M.S., OTTOMAN, R.E., FINGERHUT, A.G.: Elimination of chromosome aberrations from human lymphocytes. Blood 27, 706 (1966).
145. NOWELL, P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 20, 462 (1960).

146. NOWELL, P.C., HIRSCH, B.E., FOX, D.H., WILSON, D.B.: Evidence for the existence of multipotential lymphohematopoietic stem cells in adult rat. *J. Cell. Physiol.* 75, 151 (1970).
147. OPPENHEIM, J.J., WANG, J., FREI, E.: Immunologic and cytogenetic studies of chronic lymphocytic leukemic cells. *Blood* 26, 121 (1965).
148. ORDER, S.E., PORTER, M., HELLMANN, S.: Hodgkin's disease: Evidence for a tumor associated antigen. *New Engl. J. Med.* 285, 471 (1971).
149. OTTESEN, J.: On the age of human white cells in peripheral blood. *Acta Physiol. Scand.* 32, 75 (1954).
150. OWEN, J.J.T., RITTER, M.A.: Tissue interaction in the development of thymus lymphocytes. *J. Exp. Med.* 129, 431 (1969).
151. PARKER, J.W., WAKASA, H., LUKES, R.J.: The morphologic and cytochemical demonstration of lysosomes and lymphocytes incubated with phytohemagglutinin by electron microscopy. *Lab. Invest.* 14, 1736 (1965).
152. PARROT, D.M.V., DE SOUSA, M.: Thymus dependent and thymus independent populations: Origin, migratory patterns and lifespan. *Clin. Exp. Immunol.* 8, 663 (1971).
153. PERERA, D.J.B., PEGRUM, G.D.: A factor causing enhanced viability of lymphatic leukaemic lymphocytes. *Acta Haemat.* 52, 273 (1974).

154. PERNIS, B., BROUET, J.C., SELIGMANN, M.: IgD and IgM on the membrane of lymphoid cells in macroglobulinemia. Evidence for identity of membrane IgD and IgM antibody activity in a case with anti-IgG receptors. *Europ. J. Immunol.* 4, 776 (1974).
155. PIERCE, C.W., PEAVY, D.L., TAKAKUMA, T.: Suppressor T-cells as regulators of lymphocyte functions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 256, 365 (1975).
156. POGO, B.G.T., ALLFREY, V.G., MIRSKY, A.E.: RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* 55, 805 (1966).
157. PREUD'-HOMME, J.L., SELIGMANN, M.: Surface bound immunoglobulins as a cell marker in human lymphoproliferative disease. *Blood* 40, 777 (1972).
158. QUAGLINO, D., COWLING, D.C., HAYHOE, F.G.J.: Cytochemical and autoradiographic studies on normal leukaemic cell short-term tissue cultures. *Brit. J. Haemat.* 10, 417 (1964).
159. QUASTEL, N.R., DOW, D.S., KAPLAN, J.G.: Stimulation of K-42-uptake into lymphocytes by phytohemagglutinin and role of intracellular K^+ in lymphocyte transformation. In: *Proc. Fifth Leukocyte Culture Conf.* (Ed. Harris, J.E.) Academic Press, New York - London, 97. (1970).
160. RABELLINO, E., GREY, H.M.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. III. Bursal origin of surface immunoglobulins on chicken lymphocytes. *J. Immunol.* 106, 1418 (1971).

161. RADASZKIEWICZ, T., LENNERT, K.: Lymphogranulomatosis X. Klinisches Bild, Therapie und Prognose. Dtsch. med. Wschr. 100, 1157 (1975).
162. RAFF, M.C.: T- and B-lymphocytes and immune responses. Nature 242, 19 (1973).
163. REVILLARD, J.P., BROCHIER, J., DURIX, A., BERNHARDT, J.P., BRYON, P.A., ARCHIMBAUD, J.P., FRIES, D., TRAEGER, J.: Drainage du canal thoracique avant transplantation chez des malades atteints d'insuffisance renale chronique. Nouv. Rev. Franc. Hemat. 8, 585 (1968).
164. RÜPKE, C., EVERETT, N.B.: Small lymphocyte populations in the mouse bone marrow. Cell Tissue Kinet. 6, 499 (1973).
165. RONDANELLI, E.G., MAGLIULO, E., FOSSATI, G.C., PETRONINI, S., GORINI, S.: Chronology of mitotic cycle in human plasmocyte precursors in vitro. Phase-contrast cine micrographic studies. Haematologia 3, 283 (1969).
166. ROSS, G.D., RABELLINO, E.M., POLLEY, M.J., GREY, H.M.: Combined studies on complement receptor and surface immunoglobulin bearing cells and sheep erythrocyte rosette-forming cells in normal and leukemic human lymphocytes. J. clin. Invest. 52, 377 (1973).
167. ROWE, D.S., HUG, K., FORNI, L., PERNIS, B.: Immuno-globulin D as a lymphocyte receptor. J. Exp. Med. 138, 965 (1973).

168. ROWLANDS, D.T., DANIELLE, B.P., NOWELL, P.C., WURZEN, H.A.: Characterization of lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 34, 1162 (1974).
169. RUBIN, A.D., JOHNSON, L.I., BROWN, S.M.: Lymphocyte proliferation and lymphoproliferative disorders. *Progr. exp. Tumor Res.* 13, 135 (1970).
170. RUBINSTEIN, A.S., TROBAUGH, F.E. jr.: Ultrastructure of presumptive hemopoietic stem cells. *Blood* 42, 61 (1973).
171. RUCHTI, C., COTTIER, H., CRONKITE, E.P., JANSEN, C.R., RAI, K.R.: Studies on lymphocytes. XVII. Differential lymphocyte depletion in lymphoreticular organs of the calf during continuous extracorporeal X-irradiation of the circulating blood. *Cell Tissue Kinet.* 3, 301 (1970).
172. RUDDERS, R.A.: B-lymphocyte subpopulations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 47, 229 (1976).
173. SALMON, S.E.: Immunoglobulin synthesis and tumor kinetics of multiple myeloma. *Sem. Hemat.* 10, 135 (1973).
174. SCHABEL, F.M.jr.: The use of tumor growth kinetics in planning curative chemotherapy of advanced solid tumors. *Cancer Res.* 29, 2384 (1969).
175. SCHEURLLEN, P.G., PAPPAS, A., LUDWIG, T.: Stimulation der Blutlymphozyten durch Phytohämagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose. *Klin. Wschr.* 46, 483 (1968).

176. SCHICK, P., TREPEL, F., THEML, H., BENEDEK, S., TRUMPP, P., KABOTH, W., BEGEMANN, H., FLIEDNER, T.M.: Kinetics of lymphocytes in Hodgkin's disease. *Blood* 27, 223 (1973).
177. SCHICK, P.: Lymphozytenkinetik bei lymphatischen Systemerkrankungen (Chronische lymphatische Leukämie, Lymphogranulomatose). In: *Der Immunozyt* (Ed. Begemann, H., Thöml, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1975).
178. SCHICK, P., TREPEL, F., EDER, M., MATZNER, M., BENEDEK, S., THEML, H., KABOTH, W., BEGEMANN, H., FLIEDNER, T.M.: Autotransfusion of ^3H -Cytidine-labelled blood lymphocytes in patients with Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's patients. II. Exchangeable lymphocyte pools. *Acta Haemat.* 53, 206 (1975).
179. SCHICK, P., TREPEL, F., LEHMANN-BROCKHAUS, E., NIETMANN, H.: Autotransfusion of ^3H -Cytidine-labelled blood lymphocytes in patients with Hodgkin's disease and Non-Hodgkin's patients. I. Limitations of the method. *Acta Haemat.* 53, 193 (1975).
180. SCHIFFER, L.M.: Kinetics of chronic lymphocytic leukemia. *Ser. Haematol.* 1, 3 (1968).
181. SCHLESINGER, M.: Anti-thetaantibodies for detecting thymus-dependent lymphocytes in the immune response of mice to SRBC. *Nature* 226, 1254 (1970).
182. SCHREK, R., RABINOWITZ, Y.: Effects of phytohemagglutinin on rat and normal and leukemic human blood cells. *Proc. Soc. exp. Biol.* 113, 191 (1963).

183. SCHROER, K.R., BRILES, D.E., BOXEL, J.A. van:
Idiotypic uniformity of cell surface immunoglobulin
in chronic lymphocytic leukemia. Evidence for mono-
clonal proliferation. *J. Exp. Med.* 140, 1460 (1974).
184. SCHWARTZ, R.S.: Immunoregulation, oncogenic viruses
and malignant lymphomas. *Lancet* II, 1266 (1972).
185. SCHWEITZER, M., MELIEF, C.J.M., EIJSVOOGEL, V.P.:
The nature of the transforming lymphocyte in chronic
lymphocytic leukemia. *Europ. J. Immunol.* 3, 121 (1973).
186. SELL, S., GELL, P.G.H.: Studies on rabbit lymphocytes
in vitro. Stimulation of blast transformation with
an antialotype serum. *J. Exp. Med.* 122, 423 (1965).
187. SELL, S.: Immunological deficiency diseases. *Arch.*
Path. 86, 95 (1968).
188. SELIGMANN, M., PREUD'-HOMME, J.L., BROUET, J.C.:
B- and T-cell markers in human lymphoproliferative
diseases and primary immunodeficiencies with special
reference to membrane bound immunoglobulins. *Trans-*
plant. Rev. 16, 85 (1973).
189. SEN, L., BORELLA, L.: Expression of cell surface
markers on T- and B-lymphocytes after long-term
chemotherapy of acute leukemia. *Cell. Immunol.* 9,
84 (1973).
190. SHARMAN, C., CROSSEN, P.E., FITZGERALD, P.H.:
Lymphocyte number and response to phytohemagglutinin
in chronic lymphocytic leukemia. *Scand. J. Haemat.*
3, 375 (1966).

191. SKIPPER, H.E.: Cellular kinetics associated with "curability" of experimental leukemias. In: Perspectives in leukemia (Ed. Dameshek, W., Dutcher, R.M.) Grune & Stratton, New York - London, (1968).
192. SLAUGHTER, D.P., ECONOMON, S.G., SOUTHWICK, H.W.: The surgical management of Hodgkin's disease. *Ann. Surg.* 148, 705 (1958).
193. SMITH, J.L., COWLING, D.C., BARKER, C.R.: Response of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia to plant mitogens. *Lancet* I, 229 (1972).
194. SMITH, M.A., EVANS, J., STEEL, C.M.: Age-related variation in proportion of circulating T-cells. *Lancet* II, 912 (1974).
195. SPRENT, J., MILLER, J.F.A.P.: Interaction of thymus lymphocytes with histoincompatible cells. II. Recirculating lymphocytes derived from antigen-activated thymus cells. *Cell. Immunol.* 3, 385 (1972).
196. SPRENT, J., BASTEN, A.: Circulating T- and B-lymphocytes of the mouse: II. lifespan. *Cell. Immunol.* 7, 40 (1973).
197. SÖRENSEN, S.F.: The mixed lymphocyte culture interaction. *Acta Path. Microbiol. Scand., Sect. B. Suppl.* 230 (1972).
198. STEIN, H.: Immunchemische und immunzytologische Befunde bei Non-Hodgkin-Lymphomen. In: Maligne Lymphome und Monoklonale Gammopathien (Ed. Löffler, H.) J.F. Lehmanns Verlag, München, 167 (1976).

199. STOHLMANN, F. Jr.: Erythroid aplasia: An autoimmune complication of chronic lymphocytic leukemia. *Clin. Res.* 19, 566 (1971).
200. STROBER, S.: Initiation of antibody responses by different classes of lymphocytes. V. Fundamental changes in the physiological characteristics of virgin thymus independent ("B") lymphocytes and "B" memory cells. *J. Exp. Med.* 136, 851 (1972).
201. STRUM, S.B., RAPPAPORT, H.: Significance of focal involvement of lymphnodes for the diagnosis and staging of Hodgkin's disease. *Cancer* 24, 128 (1969).
202. STUTMAN, O., YUNIS, E.J., GOOD, R.A.: Studies on the thymus function. I. Cooperative effect of thymic function and lymphohemopoietic cells in restoration of neonatally thymectomized mice. *J. Exp. Med.* 132, 583 (1970).
203. TADA, T., TANIGUCHI, M., TAKEMORI, T.: Properties of primed suppressor T-cells and their products. In: *Transplantation Reviews* (Ed. Möller, G.) Copenhagen: Munksgaard, 26, 106 (1975).
204. TATARSKY, I.: Transient erythroid hypoplasia in chronic lymphocytic leukemia. *New Istanbul Contrib. Clin. Sci.* 10, 130 (1972).
205. TERNYNCK, T., DIGHIERO, G., FOLLEZOU, O., BINET, I.L.: Comparison of normal and CLL-lymphocyte surface Ig-determinants. *Blood* 43, 789 (1971).
206. THEML, H.: Die chronische lymphatische Leukämie. In: *Handbuch der Inneren Medizin* II/6 (Ed. Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1973).

207. THEML, H., TREPEL, F., SCHICK, P., KABOTH, W., BEGEMANN, H.: Kinetics of lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia: Studies using continuous ^3H -thymidine infusion in two patients. *Blood* 42, 623 (1973).
208. THIEL, E., DÖRMER, P., EULITZ, M.: Quantitative ^{125}J -Autoradiographie einzelner Zellen. *Histochem.* 43, 33 (1975).
209. THOMAS, E.D., BUCKNER, C.D., STORB, R., NEIMAN, P.E., FEFER, A., CLIFT, R.A., SLICHTER, S.J., FUNK, D.P., BRYANT, J.I., LERNER, K.E.: Aplastic anaemia treated by marrow transplantation. *Lancet* I, 284 (1972).
210. THONG, Y.H., BINDER, R.A., SVERAK, L.Z., BELLANTI, J.A.: Functional studies of T- and B-lymphocytes in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Southern Medical Journal* 67, 138 (1974).
211. TINDLE, B.H., PARKER, J.W., LUKES, R.J.: "Reed-Sternberg-cells" in infectious mononucleosis. *Am. J. clin. Path.* 58, 607 (1972).
212. TORELLI, U.L., HENRY, P.H., WEISSMANN, S.M.: Characteristics of the RNA-synthesized in vitro by the normal human small lymphocyte and the changes by phytohemagglutinin stimulation. *J. clin. Invest.* 47, 1083 (1968).
213. TRENTIN, J., WOLF, N., CHENG, V., FAHLBERG, W., WEISS, D., BONHAG, R.: Antibody production of mice repopulated with limited numbers of clones of lymphoid cell precursors. *J. Immunol.* 98, 1326 (1967).

214. TREPEL, F.: Kinetik lymphatischer Zellen. In: Lymphozyt und klinische Immunologie (Ed. Thewl, H., Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 16 (1975).
215. TREPEL, F., SCHICK, P.: Dynamik im lymphatischen Zellsystem. Kinetik und Regulation der Lymphozyten. Med. Klin. 70, 581 (1975).
216. TREPEL, F.: Das lymphatische Zellsystem. Struktur, allgemeine Physiologie und allgemeine Pathophysiologie. In: Handbuch der Inneren Medizin II/3: Leukozytäres und retikulozytäres System I (Ed. Begemann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1976).
217. TREPEL, F., SCHICK, P.: Proliferation und Wachstum von lymphatischen Zellpopulationen bei malignen Lymphomen. In: Maligne Lymphome und monoklonale Gammopathien (Ed. Löffler, H.) J.F. Lehmanns Verlag, München, 33. (1976).
218. TREPEL, F., SCHICK, P.: Morbus Hodgkin - eine atypische Immunreaktion. Med. Klin. 72, 1003 (1977).
219. TYLER, R.W., EVERETT, N.B.: A radioautographic study of haemopoietic repopulation using irradiated parabiotic rats: Relation to the stem cell problem. Blood 28, 873 (1966).
220. UNANUE, E.R., GREY, H.H., RABELLINO, E., CAMPBELL, P., SCHMIDTKE, J.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. II. The bone marrow as the main source of lymphocytes with detectable surface bound immunoglobulin. J. Exp. Med. 133, 1168 (1971).

221. VALENTINE, F.T.: The transformation and proliferation of lymphocytes in vitro. In: Cell-mediated immunity. In vitro correlates. Basel: Karger, 6 (1971).
222. VASSAR, P.S., CULLING, C.F.A.: Cell surface effects of phytohemagglutinin. *Nature* 202, 610 (1964).
223. VITETTA, E.S., GRUNDKE-IQBAL, I., HOLMES, K.V., UHR, J.W.: Cell surface immunoglobulin. VII. Synthesis, shedding and secretion of immunoglobulins by lymphoid cells of germ free mice. *J. Exp. Med.* 139, 862 (1974).
224. WALFORD, R.L., TITTOR, W.: Der Einfluß des lymphatischen Systems auf den Alterungsvorgang. In: *Lymphozyt und klinische Immunologie* (Ed. Thöml, H., Bege-
mann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 78 (1975).
225. WILSON, D.B., BEYTH, J.L., NOWELL, P.C.: Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. III. Kinetics of the response. *J. Exp. Med.* 128, 1157 (1968).
226. WILSON, J.D., NOSSAL, G.J.V.: Identification of human T- and B-lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* II, 788 (1971).
227. WOLSTENCROFT, R.A., MATHEW, M., OATES, C., MAINI, R.M., DUMONDE, D.C.: Lymphocyte mitogenic factor in cell-mediated immunity. In: *The Role of Lymphocytes and Macrophages in the Immunological Response* (Ed. Dumonde, D.C.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, (1971).

228. WU, A.M., TILL, T.E., SIMINOVITCH, C., McCULLOCH, E.A.: Cytological evidence for a relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 127, 455 (1968).
229. WYBRAN, J., CHANTLER, S., FUDENBERG, H.H.: Isolation of normal T-cells in chronic lymphatic leukemia. *Lancet* I, 126 (1973).
230. YOFFEY, J.M.: Stem cell role of the lymphocyte-transitional cell (LT) compartment. In: CIBA-Foundation Symposium 13: Hemopoietic Stem Cells, Elsevier, Amsterdam - London - New York, Excerpta Medica, North Holland, 5 (1973).
231. ZIMMERMANN, A., BRUN DEL RE, G., BÜRKI, H., KELLER, H.U., HESS, M.W., COTTIER, H.: Lymphozytenformen - Morphologische und funktionelle Charakterisierungsmöglichkeiten, Herkunft und Entwicklung. In: Lymphozyt und klinische Immunologie (Ed. Thelml, H., Bege-mann, H.) Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York, 2 (1975).
232. ZUCKER-FRANKLIN, D.: The ultrastructure of lymphocytes. *Sem. Hemat.* 6, 4 (1969).

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. Begemann, danke ich für die Überlassung dieser Arbeit und für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Hämatologischen Labors seiner Klinik zu benutzen.

Bei der Durchführung leistete mir Herr Dr. med. H. Theml Beistand. Seine und Herrn Dr. med. P. Schicks unermüdlige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Kritik erleichterten mir wesentlich die Einarbeitung in die Thematik.

Für die Unterstützung bei der medizinisch-technischen Durchführung der Arbeit danke ich insbesondere Fräulein Jutta Döhrmann.

Lebenslauf

- 9.1.1949 geboren in München als Sohn des Kraftfahrzeughandwerkers Roland Eckstein und seiner Ehefrau Edeltraud Eckstein geb. Lukoschus.
- 1955 - 1959 Besuch der Grundschule in München.
- 1959 - 1968 Besuch des humanistischen Wilhelms-Gymnasiums in München, Abitur 1968.
- 1968 - 1970 Ableistung des 18monatigen Grundwehrdienstes bei der Bundeswehr.
- 1970 - 1976 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, naturwissenschaftliche Vorprüfung 1971, ärztliche Vorprüfung 1972, ärztliche Prüfung 1976.
- 1.7.1976 - 31.10.1976 Medizinalassistent auf der chirurgischen Abteilung des Städt.Krankenhauses München-Oberföhring, Chefarzt Dr.Dr.S.Snopkowski.
- 1.12.1976 - 31.3.1977 Medizinalassistent an der I.Med.Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, Klinikum Großhadern, Professor Dr.G.Riecker.
- 1.4.1977 - 31.7.1977 Medizinalassistent auf der internen Abteilung des Deutschen Herzzentrums München, Professor Dr.W.Rudolph. Seit 1.8.1977 Assistenzarzt auf der gleichen Abteilung.

